



UN/M  
POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
Facultad de Química

CARACTERIZACIÓN DE PIROFOSFATASAS EN  
RELACIÓN CON LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN  
PLANTAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**Eric Edmundo Hernández Domínguez**

Tutor: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

México D.F. 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Jurado asignado**

<b>Presidente</b>	<b>Dra. Martha Patricia Coello Coutiño</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dra María de la Paz Sánchez Jiménez</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr. Jorge Nieto Sotelo</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dr Felipe Cruz García</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dr. León Patricio Martínez Castilla</b>

## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por su tutoría, paciencia y dedicación en la realización de este proyecto de doctorado.

También agradezco a mi comité tutorial formado por la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y el Dr. Alejandro Sosa Peinado y mi jurado de examen por su contribución en este proyecto, a la M.C. Lilian Valencia Turcotte por su apoyo en el laboratorio, a la Dra. Diana Sánchez Rangel por sus comentarios y sugerencias y a todos mis compañeros de laboratorio L-115 por el apoyo brindado durante todo este tiempo.

Finalmente agradezco a Leticia García y Adelina González por su apoyo, a la facultad de Química y a la UNAM.

EEHD fue becario CONACyT 195662,  
El proyecto se financió con recursos del proyecto CONACyT CB2008-1/101186,  
PAPIIT-DGAPA-UNAM 210212 (y 210909), PAIP-FQ-UNAM 4290-09.

## Resumen

El pirofosfato (PPi) es considerado un producto secundario de la biosíntesis de varios compuestos vitales en las células como los ácidos nucleicos y las proteínas. Las enzimas pirofosfatasas (PPasas) son las encargadas de catalizar la hidrólisis de PPi, su actividad es esencial y forman parte del metabolismo del fósforo (P). Durante períodos de estrés por falta de P las plantas llevan a cabo muchos procesos para maximizar la adquisición de este macronutriente. Cambian la arquitectura de sus raíces, dirigen el movimiento a larga distancia de miRNAs y pueden provocar la inducción de una gran cantidad de genes. De manera semejante a la deficiencia de P, la falta de oxígeno (anoxia) altera el metabolismo celular dificultando el crecimiento y es considerada un problema de interés en especies que viven en lugares propensos a la inundación.

*Phaseolus vulgaris* (frijol común) es una leguminosa de gran interés agrícola y su producción está limitada por la disponibilidad de fosfato (Pi). Muchos estudios sobre su respuesta a la deficiencia de P y a varias condiciones de estrés se han publicado a lo largo de los últimos 20 años por lo que es una excelente modelo de estudio. Por otro lado, *Taxodium mucronatum* (Ahuehuete) es el árbol nacional de México y es una especie de los bosques de galería (formados por vegetación que crece en las orillas de los ríos). Este árbol puede crecer en sitios propensos a la inundación y puede ser un modelo útil para entender las adaptaciones a las condiciones de anoxia. Infortunadamente, existe poca información de las pirofosfatasas de estas dos especies y de cómo la deficiencia de P y la anoxia pueden modificar su expresión en los diferentes tejidos.

El siguiente trabajo está dividido en dos capítulos y en cada uno de ellos se aborda con un enfoque diferente el tema de las PPasas y su relación con algún tipo de estrés. El capítulo uno es la parte medular del proyecto de doctorado y en él se investigó la respuesta de las PPasas a nivel de mensaje y actividad en plantas de frijol en condiciones control y cuando fueron sometidas a deficiencia de fósforo. Con la ayuda de las bases de datos de EST y de la técnica de 3'RACE se identificaron los mensajeros de tres PPasas. Mediciones en el contenido de fósforo junto con otros parámetros fisiológicos (contenido de pigmentos fotosintéticos y % de humedad) sirvieron para comprobar las condiciones de estrés en las plantas de frijol.

Mediante la técnica de RT-PCR tiempo real se observaron cambios en la expresión de tres mensajeros de las PPasas y de cuatro genes involucrados en la homeostasis del fósforo y se demostró que el estrés por falta este elemento cambia los niveles de los mRNAs para las PPasas de manera dependiente del tipo de tejido analizado. Estos resultados se corroboraron mediante un análisis de secuenciación masiva de las hojas que presentaron los cambios mas significativos por el estrés. Además, con los datos generados del estudio del transcriptoma, se identificaron tres nuevas secuencias de PPasas y se documentaron los cambios en la expresión de una gran variedad de genes debido a la deficiencia de P. Finalmente, usando geles nativos se observaron cambios en la actividad PPasa de los diferentes tejidos de las plantas control y en condiciones de ausencia de fósforo.

En el capítulo dos se describe un trabajo preliminar pero no por ello menos fascinante por primera vez se estudió la actividad de las PPasas en el árbol *Taxodium mucronatum* (Ahuehuete) en dos condiciones distintas, durante el desarrollo de los conos femeninos y en plántulas bajo estrés por inundación. Durante los diferentes estadios de desarrollo de los conos de *T. mucronatum* se observaron cambios en la actividad de una PPasas, mientras que en condiciones de estrés por inundación se registraron cambios en la actividad de dos PPasas.

# Índice de contenido

Resumen.....	4
Capitulo 1.....	8
Caracterización de pirofosfatasas de <i>Phaseolus vulgaris</i> en condiciones de estrés por fósforo .....	8
1 Abstract.....	9
2 Introducción.....	10
3 Antecedentes.....	13
3.1 El pirofosfato.....	13
3.2 Las pirofosfatasas .....	16
3.2.1 Las pirofosfatasas inorgánicas clásicas.....	17
3.2.2 Las pirofosfatasas de protones.....	19
3.3 Aspectos fisiológicos de las pirofosfatasas.....	24
3.3.1 Las pirofosfatasas solubles inorgánicas.....	24
3.3.2 Las pirofosfatasas de protones .....	27
3.4 El estrés de fósforo en las plantas.....	28
4 Hipótesis.....	33
5 Objetivos.....	33
5.1 Objetivo General.....	33
5.2 Objetivos Particulares.....	33
6 Materiales y Métodos.....	34
6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento de las plantas.....	34
6.2 Fotografías de las hojas en condiciones de ausencia de fósforo y control.....	34
6.3 Determinación del índice SPAD y del contenido de agua.....	35
6.4 Cuantificación de los pigmentos.....	35
6.5 Determinación del contenido de fósforo.....	35
6.6 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA .....	36
6.7 Identificación de las secuencias de los mRNAs de las pirofosfatasas.....	36
6.8 Construcción de los arboles filogenético.....	37
6.9 Diseño de los oligonucleótidos para el PCR cuantitativo.....	37
6.10 Condiciones y análisis de los mensajeros por PCR cuantitativo.....	37
6.11 Extracción de la proteína soluble.....	39
6.12 Ensayos de la actividad de las pirofosfatasas.....	39
6.12.1 Ensayo de la actividad total de las pirofosfatasas dependientes de Mg <sup>2+</sup> .....	39
6.12.2 SDS-PAGE y electroforesis nativa.....	40
6.13 Secuenciación masiva y ensamblado del transcriptoma de las hojas H5 de frijol en condiciones de deficiencia de fósforo .....	40
7 Resultados.....	42
7.1 Caracterización de las plantas de frijol en condiciones de deficiencia de fosfato.....	42
7.2 Identificación de las secuencias que codifican para las pirofosfatasas de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	47
7.3 Filogenia de las pirofosfatasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	50
7.4 Análisis de la expresión de los RNA mensajeros de las pirofosfatasas bajo deficiencia de fósforo.....	55

7.5 Estudio de la transcripción en las hojas H3 y H5 de <i>P. vulgaris</i> mediante secuenciación masiva.....	61
7.6 Determinación de la actividad de las pirofosfatasa en diferentes órganos de las plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	65
8 Discusión.....	67
9 Conclusiones.....	75
10 Figuras suplementarias .....	76
11 Artículo.....	99
Capitulo 2.....	100
Un estudio preliminar de las pirofosfatasas de <i>Taxodium mucronatum</i> .....	100
1 Abstract.....	101
2 Introducción.....	102
3 Antecedentes.....	104
3.1 Deficiencia de oxígeno en las plantas .....	104
4 Hipótesis.....	111
5 Objetivos.....	111
5.1 Objetivos generales.....	111
5.2 Objetivos Particulares.....	111
6 Materiales y métodos.....	112
6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento.....	112
6.2 Extracción del tejido y ensayo de actividad pirofosfatasa.....	112
6.3 Estrés por inundación .....	113
7 Resultados.....	113
7.1 Medición de la actividad pirofosfatasa durante el desarrollo de los conos de <i>Taxodium mucronatum</i> .....	113
7.2 Medición de la actividad pirofosfatasa en plántulas de <i>Taxodium mucronatum</i> en condiciones de inundación.....	114
8 Discusión.....	116
9 Conclusiones.....	118
10 Artículo .....	119
Bibliografía.....	120



## Capítulo 1

### Caracterización de pirofosfatasas de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés por fósforo



# 1 Abstract

Phosphorus is an essential element for all living cells, but its availability is often limiting in the soil. Plants have adapted to such limitation and respond to phosphorus deficiency. The soluble inorganic pyrophosphatases (PPase; EC 3.6.1.1) recycle the pyrophosphate produced by many biosynthetic reactions, and may play a role in the plant adaptation to phosphorus deficiency. In this work, three PPase mRNAs were identified from the *Phaseolus vulgaris* EST international database and their sequences were corroborated and completed using 3'RACE. Aminoacid sequences analysis of PPases were conducted and phylogenetics trees were made. Then, words the PPase mRNA expression was measured by qRT-PCR in leaves, stems, and roots (classified according to their position on the plant) of bean plants grown either 1 mM phosphate or under phosphate starvation. Physiological signs of stress were recorded. Real time RT-PCR revealed changes in mRNA expression, but not for all isozymes under analysis, and not for all tissues. In addition, massive sequencing was performed in the H3 and H5 leaves in phosphate deficient, and well nourished plants. Transcriptome analysis indicated changes in many transcripts. In the leaf H3 several genes of known function, and many of unknown function changed in expression, many related to phosphate metabolism and included one PPases gene. Worth noting, in the H5 leaf the most expressed genes were related to pathogen defense system. Finally, changes in the activity of some PPases were observed in zymograms. Our data are consistent with an important role for pyrophosphate in the adaptation of the plant to phosphate starvation.

## 2 Introducción

El PPI es una molécula estructuralmente simple y es considerado un producto secundario de la biosíntesis de varios compuestos vitales en las células como ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas, carotenos, aminoácidos y ácidos grasos (Geigenberger *et al.*, 1998; Stitt, 1998; Farré, *et al.*, 2001; Sonnewald, 1992; Heinonen, 2001; López-Marques *et al.*, 2004). Su hidrólisis es esencial para la célula porque hace las reacciones de biosíntesis termodinámicamente irreversibles hacia la formación de los productos (Kornberg, 1962; Heinonen, 2001) y las enzimas pirofosfatasas son las encargadas de catalizar la hidrólisis de PPI en dos moléculas de fosfato inorgánico (Pi) (Cooperman, 1982; Geigenberger, *et al.*, 1998; Stitt, 1998). Se han caracterizado cuatro superfamilias de pirofosfatasas con estructuras y funciones claramente diferentes: las pirofosfatasas inorgánicas clásicas solubles dependientes de  $Mg^{2+}$  (PPasas), las pirofosfatasas solubles dependientes de manganeso, las pirofosfatasas inorgánicas solubles emparentadas con las deshalogenasas de haloácido (Lee *et al.*, 2009; May, *et al.*, 2011) y las que bombean protones a través de las membranas (Perez-Castineira, *et al.*, 2002; López-Marqués *et al.*, 2004)

Las PPasas clásicas se pueden dividir en tres subfamilias: procariontes, animales/hongos y plantas (Sivula *et al.*, 1999). Las propiedades cinéticas, moleculares y regulatorias de las PPasas de bacterias y levadura están muy bien estudiadas (Cooperman *et al.*, 1992; Sivula *et al.*, 1999; Aavaeva, 2000; Heikinheimo *et al.*, 2001). Sin embargo, existe poca información acerca de las PPasas de las plantas y se conoce poco de sus propiedades (Navarro de la Sancha *et al.*, 2007). El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica seis pirofosfatasas (<http://www.arabidopsis.org>; AtPPasa1 al 6 ) y al menos una es plastidial (AtPPasa6; Schulze *et al.*, 2004). La localización de las otras isoformas es desconocida, pero exhiben muy alta similitud con la PPasa citoplasmática de la papa (du Jardin, *et al.*, 1995) y los programas bioinformáticos no predicen alguna localización subcelular, por lo que se sugiere una localización citoplasmática.

La importancia que tienen las PPasas en las plantas queda de manifiesto en experimentos en los que se sobreexpresó la PPasa de *Escherichia coli* en *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 2005), tabaco (Lerchl, *et al.*, 1995) o en papa (Geigenberger *et al.*, 1998), pues tiene consecuencias notables sobre la fisiología y el crecimiento de la planta, tales como una alteración significativa en la translocación de

azúcares y en su metabolismo, un menor crecimiento de las plantas y como era de suponer, una disminución del contenido de PPI (Geigenberger *et al.*, 1998; Sonnewald, 1992; Farré, *et al.*, 2006). En tabaco, la expresión de la PPasa de la levadura bajo un promotor específico para el floema, demostró que el PPI es esencial para el transporte de la sacarosa a largas distancias (Lerchl *et al.*, 1995). Además de estos experimentos, las plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresaban de manera constitutiva a la PPasa de *E. coli* mostraron menor crecimiento, tasas menores de fotosíntesis y niveles altos de glucosa y fructuosa, pero sin cambios en la acumulación de sacarosa y almidón, ni en la cinética de germinación (Jelitto *et al.*, 1992; Sonnewald 1992; Lee *et al.*, 2005). Así, es clara la importancia del PPI en la integración del metabolismo primario entre los tejidos fuente y demanda, así como el control de los flujos de carbono.

Las PPasas forman parte del metabolismo del fósforo (P) y se sabe que durante períodos de estrés por falta de este macronutriente, las plantas llevan a cabo muchos procesos para maximizar la adquisición del fosfato (Pi) inorgánico (K. Raghothama, 1999). Por ejemplo, cambian la arquitectura de sus raíces para incrementar la absorción de Pi (Bates y Lynch, 1996; López-Bucio *et al.*, 2002), aumentan la secreción de fosfatasas y ácidos orgánicos (como citrato y L-malato) en las raíces, inducen la expresión de transportadores de Pi de alta afinidad (Yang y Finnegan, 2010) y dirigen el movimiento a larga distancia de miRNAs desde la parte aérea hacia las raíces ( Lin *et al.*, 2008; Pant, *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2009). Todas estas adaptaciones se asocian a la inducción de más de 600 genes durante la deficiencia de P (Misson, *et al.*, 2005). Se ha sugerido que las PPasas pueden ser importantes para las plantas en condiciones de deficiencia de Pi, pero curiosamente la deficiencia de fósforo provoca una reducción de los niveles de ATP, que no se traduce en cambios en los niveles de PPI (Duff *et al.*, 1989; Carswell *et al.*, 1997; Rychter y Randall, 1994) Una reducción en la carga energética está asociada a una reducción del crecimiento y la biosíntesis; es decir, a una menor generación de PPI, por lo tanto, se esperaría que la expresión a nivel del mensaje, la proteína y/o la actividad de las enzimas encargadas de su reciclado deberían modificarse para adecuarse al nuevo nivel de producción, explicando así los niveles constantes de PPI.

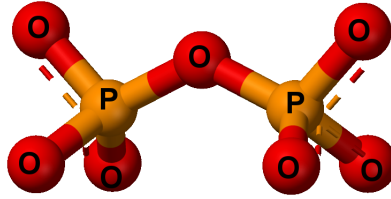
*Phaseolus vulgaris* (Frijol común) es una leguminosa de gran interés agrícola y su producción está limitada por la disponibilidad de Pi y pese a que su genoma esta secuenciado de manera parcial, se han publicado muchos estudios en los últimos 20 años sobre la respuesta que tiene la planta a la

deficiencia de P, así como a varias condiciones de estrés por lo que lo hace un excelente modelo de estudio. Desafortunadamente, existe poca información de las PPasas de esta especie y de cómo la deficiencia de P modifica su expresión en los diferentes tejidos. Por lo que, en este trabajo se identificaron las secuencias de tres mRNAs que codifican PPasas de frijol. Se analizó su expresión a nivel de mensaje por qRT-PCR y su actividad usando geles nativos en diez diferentes tejidos de plantas control y en plantas en condiciones de ausencia de Pi.

## 3 Antecedentes

### 3.1 El pirofosfato

El pirofosfato (PPi; Figura 1) se descubrió alrededor del siglo XIX (Heinonen, 2001) y la primera reacción biológica en la que se formó PPi fue descrita por Kornberg (1948). El PPi es un anhídrido de ácido resultado de la condensación de dos grupos fosfato. Usando condiciones similares a las que imperan en el citoplasma de las células vegetales, Davies y colaboradores (1993) predijeron un valor de  $\Delta G'$  de hidrólisis para el PPi de  $-23,7$  kJ/mol, que representa alrededor de la mitad de la energía proporcionada por el ATP. Esta liberación de energía es esencial para la célula volviendo las reacciones de biosíntesis termodinámicamente irreversibles (Kornberg, 1962). La síntesis de muchas moléculas biológicas como: los ácidos nucleicos, los carbohidratos, las proteínas, los carotenos, los aminoácidos y los ácidos grasos está asociada a la formación de PPi (Geigenberger *et al.*, 1998; Stitt, 1998; Farré, *et al.*, 2001; Sonnewald, 1992; Heinonen, 2001; Lopez-Marques *et al.*, 2004). Por ejemplo; durante la síntesis de almidón y sacarosa, se forma una molécula de PPi por cada unidad de glucosa incorporada en un minuto. En las plantas la síntesis de almidón y sacarosa por la ADP 6-glucosa pirofosforilasa produce un PPi por cada unidad de glucosa incorporada y en un trabajo reportado por Stitt y colaboradores (1985), se determinó que las hojas de espinaca producen en un minuto alrededor de  $0.3$   $\mu$ moles de sacarosa/mg de clorofila<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, en tanto Gerhardt y Heldt (1984) determinaron que el volumen del citosol es de  $20\mu$ l/mg de clorofila, por lo que la velocidad de producción de PPi debida a la síntesis de sacarosa sería aproximadamente 15mM/min. También, se ha reportado que la mitocondria de las plantas es capaz de producir PPi directamente a partir de Pi. Kowalczyk y Masłowski, (1984) midieron una velocidad de síntesis de PPi de alrededor de 12mM/min en mitocondrias aisladas de plántulas de maíz. Se espera una producción más elevada de PPi en las plantas C<sub>4</sub> (maíz, sorgo, amaranto y caña de azúcar, entre otras plantas), ya que en el ciclo C<sub>4</sub> una molécula de PPi se produce por cada CO<sub>2</sub> incorporado. En hojas de maíz, las estimaciones de la velocidad de asimilación del CO<sub>2</sub> la fijan en  $3.5$   $\mu$ moles de CO<sub>2</sub> asimilado/mg de clorofila<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>. Suponiendo que el volumen del estroma del cloroplasto es de  $25\mu$ l/mg de clorofila la velocidad de producción de PPi sería cercana a 140 mM/min por lo que se cree que las plantas C<sub>4</sub> son capaces de producir PPi mas rápido que cualquier otro organismo (Heinonen, 2001).



**Figura 1. Modelo estructura realizado con esferas y varillas de la molécula de pirofosfato. Los átomos de fósforo (P) se representan como esferas anaranjadas, los átomos de oxígeno (O) en color rojo y las varillas representan los enlaces. La representación corresponde al tetraanión que sería dominante en condiciones alcalinas.**

El PPi puede ser utilizado como donador de energía en tres reacciones que ocurren en el citosol de las plantas (Figura 2): (i) la fosforilación dependiente de PPi de la fructosa-6-P catalizada por la enzima fosfotransferasa dependiente de pirofosfato (PFP), (ii) la conversión de UDP-glucosa a UTP y glucosa-1-P catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa) y (iii) el transporte de protones acoplado a la hidrólisis de PPi por la H<sup>+</sup>-PPasa de la membrana vacuolar (Dancer *et al.*, 1990). La anterior sugiere que el PPi puede operar como un donador secundario de energía en el citosol de las células de las plantas (Weiner *et al.*, 1987; Dancer *et al.*, 1990; Stitt, 1998).

Todas las formas de vida requieren una fuente de energía libre y el PPi ha sido propuesto como la moneda energética en las primeras etapas de la vida en la tierra. Esta idea fue introducida por primera vez por Lipmann (1995) y defendida por otros autores que han incorporado consideraciones sobre los descubrimientos recientes del metabolismo de diversos grupos filogenéticos (Baltscheffsky, (1997; Chi y Kemp; 2000; Pérez-Castiñeira *et al.*, 2001). Además, existen varios estudios de cómo el PPi se pudo formar en la tierra primitiva (ver Heinonen, 2001). El hecho de que fosfoanhidridos puedan actuar como una fuente de energía en ausencia de enzimas (Rabinowitz, *et al.*, 1969; Schwartz y Ponnampuruma, 1968) refuerza la hipótesis de que el PPi funcionara como un donador de energía.





## 3.2 Las pirofosfatasas

Las pirofosfatasas inorgánicas (EC 3.6.1.1) son las enzimas encargadas de hidrolizar el PPi en dos moléculas de fosfato inorgánico (Pi). Se han caracterizado enzimas con actividad de pirofosfatasa y alta especificidad por pirofosfato en cuatro superfamilias de proteínas cuya secuencia de aminoácidos, estructura y posiblemente sus funciones fisiológicas resultan diferentes. Las cuatro superfamilias incluyen: 1) las pirofosfatasas inorgánicas clásicas (PPasas) (Sivula *et al.*, 1999; Cooperman *et al.*, 1992; Gómez-García *et al.*, 2007), 2) las pirofosfatasas dependientes de manganeso (Parfenyev *et al.*, 2001; Rantanen, *et al.*, 2007; Tuominen *et al.*, 2010), 3) las pirofosfatasas inorgánicas solubles emparentadas con las deshalogenasas de haloácido (Lee *et al.*, 2009; May *et al.*, 2011) y 4) las de membrana de la vacuola (H<sup>+</sup>-PPasas) (Rojas-Beltrán *et al.*, 1999; Perez-Castineira *et al.*, 2002; López-Marqués *et al.*, 2004). Las PPasas clásicas están ampliamente distribuidas en toda la filogenia y los miembros de esta superfamilia reportados a la fecha no parecen tener otras actividades enzimáticas (Sivula *et al.*, 1999; Gómez-García *et al.*, 2007). Las pirofosfatasas dependientes de manganeso fueron descubiertas recientemente (Young *et al.*, 1998; Shintani, 1998), están presentes en Eubacteria en los géneros *Bacillus*, *Clostridium* y en otros linajes de bacterias, Archaea y en varios patógenos de humano como *Giardia lamblia*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus mutans* y se caracterizan por ser más activas con Mn<sup>2+</sup> o Co<sup>2+</sup> (Young *et al.*, 1998; Shintani, 1998). En algunas de estas proteínas se encuentra un dominio CBS (*cystathionine β -synthase*) regulatorio que permite unir nucleótidos de adenina y así modular su actividad (Tuominen *et al.*, 2010), también está presente en proteínas de humanos (Jämsen *et al.*, 2011) y mutaciones en este dominio están asociadas a enfermedades hereditarias y pertenecen a la familia de las DHH (Asp-His-His) fosfohidrolasas (Aravind y Koonin, 1998). Las pirofosfatasas de la familia de las dehalogenasas de haloácido han sido reportadas recientemente en bacterias (Lee *et al.*, 2009) y plantas (May *et al.*, 2011) y su función como PPasa sólo ha sido estudiada en bacterias (Huang *et al.*, 2011). Por otro lado, la familia de las H<sup>+</sup>-PPasas son bombas primarias que acoplan la hidrólisis del PPi a la generación de un gradiente de protones transmembranal, por lo que pueden tener un papel importante en la bionergética de las células que las poseen (Baltscheffsky *et al.*, 1999; Drozdowicz *et al.*, 2001).

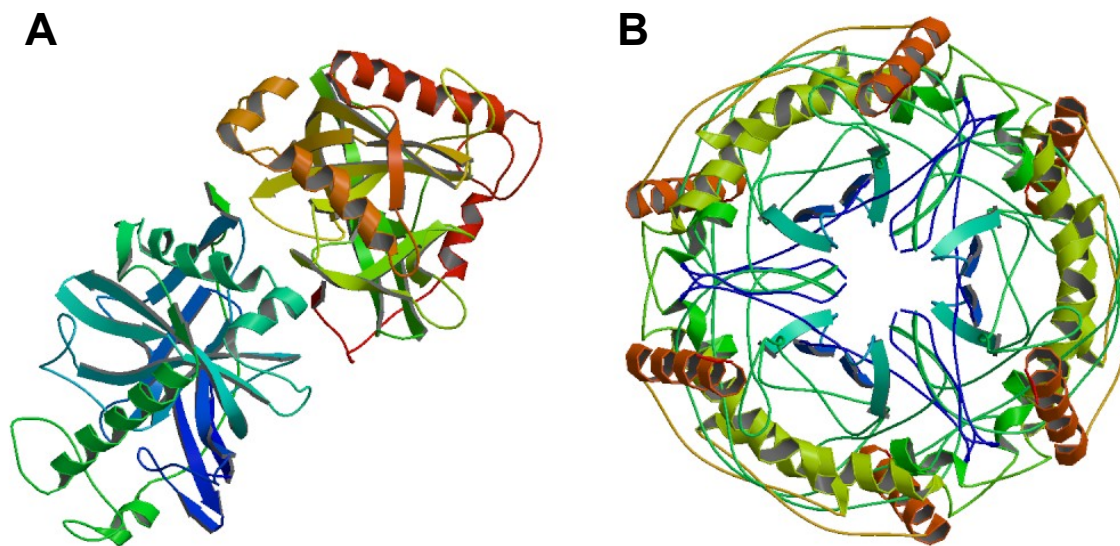
Las PPasas son esenciales para los organismos (Chen *et al.*, 1990; Lundin *et al.*, 1991) al hidrolizar específicamente el PPi formado durante las reacciones de biosíntesis. Como se mencionó anteriormente, las plantas pueden producir grandes cantidades de PPi que debe ser hidrolizado ya que su acumulación desplazaría el equilibrio de la biosíntesis y detendría el crecimiento (Kornberg, 1948). Por ejemplo, una alta actividad pirofosfatasa podría ser requerida en el cloroplasto (Weiner *et al.*, 1987) durante la fotosíntesis, para soportar la acumulación de almidón. En el caso de las plantas C<sub>4</sub>, los cloroplastos del mesófilo presentan una alta actividad PPasa (15-60 μmol/mg de clorofila por minuto) (Hatch y Slack, 1968), lo que posiblemente es, una adaptación de la fotosíntesis C<sub>4</sub> (Heinonen, 2001).

### 3.2.1 Las pirofosfatasas inorgánicas clásicas

Las pirofosfatasas inorgánicas clásicas (PPasa) son enzimas ubicuas, ya que las podemos localizar en todos los organismos y se encuentran entre las enzimas de hidrólisis del grupo fosforilo mejor caracterizadas (Cooperman *et al.*, 1992; Baykov *et al.*, 1999; Heikinheimo *et al.*, 2001). La superfamilia de las PPasas clásicas agrupa a la mayoría de las enzimas conocidas, son dependientes de Mg<sup>2+</sup> y tiene poca actividad con Mn<sup>2+</sup> (Navarro de la Sancha *et al.*, 2007). Las PPasas clásicas con respecto a su secuencia y tamaño se pueden dividir en tres grupos: procariontes, animales/hongos y plantas, con 162-220, 211-216 y 280-292 aminoácidos, respectivamente (Sivula *et al.*, 1999). Las PPasas de los procariontes son funcionales como homohexámeros con un arreglo de dímero de trímeros (Liu *et al.*, 2004), en animales y hongos la proteína actúa como dímeros (Harutyunyan *et al.*, 1996), mientras que en plantas al parecer actúa como monómeros (Gómez-García *et al.*, 2006; Navarro de la Sancha *et al.*, 2007).

Las dos PPasas mejor estudiadas son las PPasas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Y-PPase) y de la bacteria *Escherichia coli* (E-PPase) que son prototipos de las PPasas de la subfamilia I (Lahti *et al.*, 1988; Kolakowski *et al.*, 1988; Reijo *et al.*, 1990; Cooperman *et al.*, 1992; Baykov *et al.*, 1999). Los alineamientos de secuencias de estas proteínas indican que los aminoácidos del sitio activo están conservados, aunque el nivel global de similitud de secuencia es bajo (Reijo *et al.*, 1990; Cooperman *et al.*, 1992; Baykov *et al.*, 1999; Gómez-García *et al.*, 2006).

Todas las PPasas clásicas requieren un catión divalente como cofactor, siendo el  $Mg^{2+}$  el más eficiente (Baykov *et al.*, 1999). En contraste, el  $Ca^{2+}$  inhibe fuertemente la actividad PPasa (de Graaf *et al.*, 2006) a concentraciones muy bajas (138nM-700nM) (Felix y Fleisch, 1975; Kurilova *et al.*, 1984; Mitchell y Minnick, 1997; Yang y Wensel, 1992). El mecanismo de inhibición inducido por  $Ca^{2+}$  de la E-PPasa ha sido investigado y se sugirieron dos posibles razones para los efectos inhibitorios del  $Ca^{2+}$ . Por un lado, el reemplazo del  $Mg^{2+}$  por el  $Ca^{2+}$  que es catalíticamente incompetente en el sitio de unión M2 a la enzima y por el otro la competencia del complejo MgPPi con el complejo no hidrolizable CaPPi (Avaeva *et al.*, 2000; Samygina *et al.*, 2001). En contraste, la PPasa mitocondrial de *Leishmania major* utiliza de manera más efectiva al  $Ca^{2+}$  que al  $Mg^{2+}$  lo que sugiere una clase ancestral de PPasas clásicas mejor adaptadas a un ambiente rico en calcio (Gómez-García, *et al.*, 2004).



**Figura 3. Pirofosfatasa inorgánica soluble de la familia I. A) Representación esquemática de la estructura tridimensional de las pirofosfatasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a 3 Å de resolución (código del PDB 1PYP) y B) de la pirofosfatasa de la bacteria *Escherichia coli* a 2.2 Å de resolución (código del pdb 1IGP).**

Para realizar la catálisis las PPasas requieren tres o cuatro iones metálicos (Baykov y Shestakov, 1992) dependiendo de la concentración de  $Mg^{2+}$  (0.05-50mM) y pH (a pH 6.0 se requieren cuatro iones). En las células de la levadura la concentración de  $Mg^{2+}$  son tales que se propone la predominancia del mecanismo con tres iones (Baykov y Shestakov, 1992) y la hidrólisis del complejo catión-PPi es acelerado por un factor de  $10^{10}$  en comparación con la reacción no catalizada

(Cooperman, 1982). En términos generales, la catálisis se basa en la activación de un grupo saliente y la generación de un nucleófilo efectivo (Pirkko Heikinheimo *et al.*, 1996; Heikinheimo *et al.*, 2001). El mecanismo cinético ha sido descrito mediante seis pasos: la enzima, se activa por dos iones metálicos y se une a uno o dos iones metálicos adicionales con el sustrato, la enzima sufre una isomerización y la generación del nucleófilo reactivo es ayudado por un enlace de hidrógeno de baja barrera entre un aspártico y el nucleófilo, después de la etapa de hidrólisis el fosfato de los dos complejos son liberados uno a uno y la enzima retorna a la forma con dos iones metálicos. Además, un estudio detallado del mecanismo catalítico de hidrólisis del PPi para la enzima Y-PPasa utilizando las estructuras cristalográficas de siete variantes del sitio activo en presencia de  $Mg^{2+}$  y fosfato identificó la existencia de varios pasos de hidratación que no se observaron directamente por los experimentos en solución (Oksanen *et al.*, 2007). En este trabajo se exploró el conjunto de conformaciones de baja energía accesible a los residuos del sitio activo y se demostró la existencia de varios estados de hidratación que no se habían detectado en experimentos previos, incluyendo la generación del nucleófilo y las vías de salida de los productos (Oksanen *et al.*, 2007). Las enzimas de plantas han sido poco caracterizadas, pero se propone que su mecanismo presenta la unión ordenada de iones de magnesio libre, seguida de la adición del complejo de un átomo de magnesio y del pirofosfato, lo que representa una diferencia importante con los datos reportados para las enzimas de las bacterias o de las levaduras (Navarro de la Sancha *et al.*, 2007)

### 3.2.2 Las pirofosfatasas de protones

La Pirofosfatasa translocadora de protones ( $H^+$ -PPasas; EC 3.6.1.11) se identificó por primera vez en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky *et al.*, 1966) y, posteriormente, en los acidocalcisomas de procariontes y en diversas membranas organelares (acidocalcisomas, lisosomas y vacuolas) de protistas y de las plantas (Maeshima, 2001; Pérez-Castiñeira *et al.*, 2001; Docampo *et al.*, 2005). Las  $H^+$ -PPasas son un tipo de proteína homooligomérica formada por una subunidad muy hidrofóbica que acopla la energía obtenida por la hidrólisis de PPi al transporte de protones a través de las membranas biológicas (Rea y Poole, 1986; Drozdowicz y Rea, 2001; Maeshima, 2001). Se ha demostrado que esta proteína es capaz de complementar el transporte de la ATPasa en la levadura (Serrano, *et al.*, 2007) lo que es consistente con su participación en la

producción de PPi como una fuente alternativa de energía en hongos, protistas y plantas.

Las H<sup>+</sup>-PPasas son enzimas altamente conservadas con una identidad de secuencia a nivel de aminoácidos del 85% o mayor (Drozdowicz y Rea, 2001) y este alto grado de identidad entre las H<sup>+</sup>-PPases sugieren que las H<sup>+</sup>-PPasas de una especie puede ser funcional en otra especie. Las plantas tienen dos H<sup>+</sup>-PPasas filogenéticamente distintas que han sido designadas Tipo I y tipo II. Las H<sup>+</sup>-PPasas del tipo I son dependientes del K<sup>+</sup> para su actividad y son moderadamente sensibles a la inhibición de Ca<sup>2+</sup>; en tanto que, las del tipo II son insensibles a K<sup>+</sup> pero extremadamente sensibles a Ca<sup>2+</sup>. Las H<sup>+</sup>-PPasas del tipo II se localizan y funcionan en el aparato de Golgi y su cantidad total en los tejidos es muy baja, menos del 0.2% de la H<sup>+</sup>-PPasa del tipo I (Segami *et al.*, 2010). En plantas las H<sup>+</sup>-PPasas del tipo I se encuentran en el tonoplasto (Maeshima, 2000), aunque recientemente se les ha reportado en la membrana plasmática de las células acompañantes del floema, en donde parecen ser importantes para el transporte de los nutrientes (Paez-Valencia *et al.*, 2011)

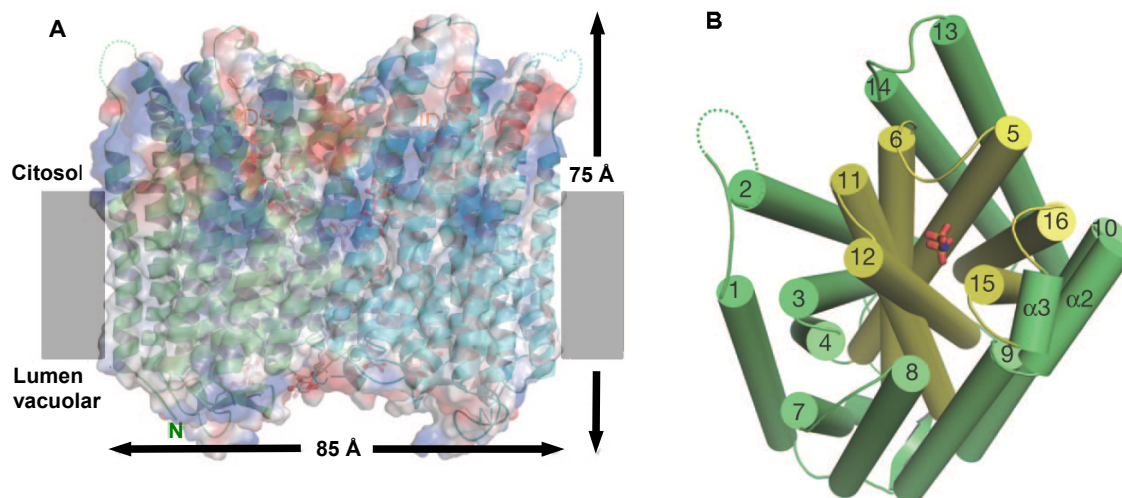
Estructuralmente, las H<sup>+</sup>-PPasas representan el grupo más simple entre las bombas clásicas de protones del tipo primario conocidas hasta ahora y fueron las más recientemente reportadas y caracterizadas (Drozdowicz y Rea, 2001; Maeshima, 2001). Durante los años 90 se documentaron las secuencias de nucleótidos de los genes que las codifican en las plantas (Sarafian *et al.*, 1992; Drozdowicz y Rea, 2001) bacterias (Baltscheffsky, *et al.*, 1998; Baltscheffsky *et al.*, 1999) y Archaea (Drozdowicz y Rea, 2001; Drozdowicz *et al.*, 1999). Estos datos revelaron una conservación inusual de los motivos de secuencia, que son únicos de esta familia de enzimas (Serrano *et al.*, 2007). Estos motivos están formados por un tripéptido (GGG) y por dos secuencias de nueve residuos (DVGADLVGK y DNVGDNVGD) y se caracterizan por tener un alto contenido de cuatro aminoácidos, G, A, D y V y forman partes de los sitios activos para la unión y/o la reacción de hidrólisis y para la unión de los iones Mg<sup>2+</sup>. El aislamiento de las H<sup>+</sup>-PPasas de *Vigna radiata* (poroto verde) (Maeshima y Yoshida, 1989), *Beta vulgaris* (betabel) (Sarafian y Poole, 1989; Britten *et al.*, 1989) y *Cucurbita* (calabaza) (Sato *et al.*, 1991) demostró que la proteína consiste en un sólo polipéptido con una masa molecular aparente entre 66 y 73 kD (poroto verde), 64 kD (betabel) y 75 kD (calabaza). Posteriormente, la enzima de *Arabidopsis thaliana* se clonó y su expresión en un sistema heterólogo reveló que el polipeptido de 770 aminoácidos tiene una masa molecular de 80.8kD (Sarafian

*et al.*, 1992).

Las H<sup>+</sup>-PPasas presentan una estequiometría de 1:1 H<sup>+</sup>/PPi y el pH para el estado estacionario generado por la enzima es de 3.2 (Maeshima *et al.*, 1994). Su secuencia de aminoácidos presenta un motivo característico de unión a PPi (E/D)(X)<sub>7</sub>KXE y dos motivos ácidos DX<sub>3</sub>DX<sub>3</sub>D que han sido propuestos como esenciales para las funciones de la enzima (Maeshima, 2000; Rea *et al.*, 1992; Nakanishi *et al.*, 2001). De acuerdo con estudios cinéticos, el sustrato de la H<sup>+</sup>-PPasa es el complejo Mg<sub>2</sub>-PPi (Rea y Poole, 1993; Gordon-Weeks y Steele, 1996; Baykov *et al.* 1993; Leigh *et al.*, 1992) y la k<sub>M</sub> para el sustrato PPi varía entre los 130 μM (Maeshima, 1991), 2-5 μM (Baykov *et al.*, 1993) y 2 μM (Gordon-Weeks y Steele, 1996). El valor reportado de la concentración citosólica de PPi es aproximadamente 200 μM (Weiner *et al.*, 1987), por lo que la actividad H<sup>+</sup>PPasa *in vivo* sería alrededor del 60% de su actividad máxima extraíble (Maeshima, 2000).

Las H<sup>+</sup>-PPasas requieren Mg<sup>2+</sup> como cofactor esencial y su unión no sólo estabiliza y activa la enzima, también la protege de la inactivación por calor (Gordon-Weeks y Steele, 1996). Experimentos cinéticos han determinado valores de k<sub>M</sub> aparente para el Mg<sup>2+</sup> de 42 μM (Maeshima, 1991) y 20-23 μM (Gordon-Weeks y Steele, 1996). La concentración del Mg<sup>2+</sup> libre se determinó en 0.4mM (Yazaki, *et al.*, 1988) y en estas condiciones la H<sup>+</sup>-PPasa se encuentra a más del 90% de su actividad total.

Recientemente, se reportó la estructura cristalográfica de la H<sup>+</sup>-PPasa de *Vigna radiata* (VrH<sup>+</sup>-PPasa; poroto verde) formando un complejo con un análogo del sustrato que no es hidrolizable (imidodifosfato; IDP) a 2.25Å de resolución (Lin *et al.*, 2012). La VrH<sup>+</sup>-PPasa es un homodímero con una superficie muy amplia inmersa en la membrana (3241 Å<sup>2</sup>). El potencial electrostático de la superficie del dímero muestra muchos residuos hidrofóbicos en la región citosólica. Por su parte, la region vacuolar de la proteína que sobresale de la membrana es mas pequeña (Figura 4A). La proteína se empaqueta en forma de roseta con 16 hélices transmembranales (TMs) dentro de dos paredes concéntricas (Figura 4B). Las TMS se pliegan secuencialmente en contra de las manecillas del reloj, con excepción de M1, que se inclina ligeramente hacia afuera (Figura 4B). Cuatro TMs (M5, M12, M15 y M16), formando la pared interna, y dos TMs, de la pared exterior, participan en la interacción entre las subunidades, que incluyen múltiples interacciones hidrofóbicas: seis enlaces de hidrógeno y dos puentes de sal.



**Figura 4. Modelos esquemáticos generados a partir de la estructura cristalográfica para la pirofosfatasa de protones (VrH<sup>+</sup>-PPasa; código PDB: 4A01) formando un complejo con IDP (imidodifosfato). (A) Superposición del diagrama de cintas (verde-Azul) y la superficie de potencial molecular electrostática para el dímero de la VrH<sup>+</sup>-PPasa (rojo, azul y blanco indican potencial negativo, positivo y neutro respectivamente). (B) Las seis TMs internas (verde claro) y las diez TMs exteriores (verde oscuro) se muestran como cilindros. El IDP se observa como palos en color CPK. Modificado de (Lin *et al.*, 2012).**

El sitio de unión del sustrato es una cavidad en forma de embudo formado por seis TMs con un volumen accesible al solvente de 1521 Å<sup>3</sup>. La cavidad tiene un ambiente inusualmente ácido con 12 residuos de aminoácidos ácidos. Tres residuos de lisina y un residuo de asparagina también se encuentran en la cavidad. Todos estos residuos son altamente conservados en las H<sup>+</sup>-PPasas. Además, un ion K<sup>+</sup> y cinco Mg<sup>2+</sup> están presentes rodeando a la molécula de IDP. El K<sup>+</sup> es un activador de las PPasas del tipo I (Rea y Poole, 1993) y el Mg<sup>2+</sup> es esencial para la actividad de las H<sup>+</sup>-PPasas (Gordon-Weeks y Steele, 1996).

En la Figura 5, el sustrato y los residuos del sitio activo de la enzima VrH<sup>+</sup>-PPasa se compararon por superposición con los de la PPasa de *Escherichia coli* (EcPPasa). Ambas enzimas contienen varios residuos de aspártico para coordinar los iones magnesio a la unión del sustrato en el sitio activo. Existen cinco y cuatro átomos de Mg<sup>2+</sup> en la cavidad del sitio de la VrH<sup>+</sup>-PPasa y de la EcPPasa, respectivamente. La unión del magnesio cinco al IDP es detectado sólo en la VrH<sup>+</sup>-PPasa y la localización de los magnesios tres y cuatro es similar en ambas proteínas. En contraste, los magnesios uno y dos están localizados en una posición distinta. En la EcPPasa los Mg<sup>2+</sup> se unen con el inhibidor específico F<sub>2</sub>, que ocupa la posición del nucleófilo cerca del fosfato dos del PPI, lo que impide la





### 3.3 Aspectos fisiológicos de las pirofosfatasas

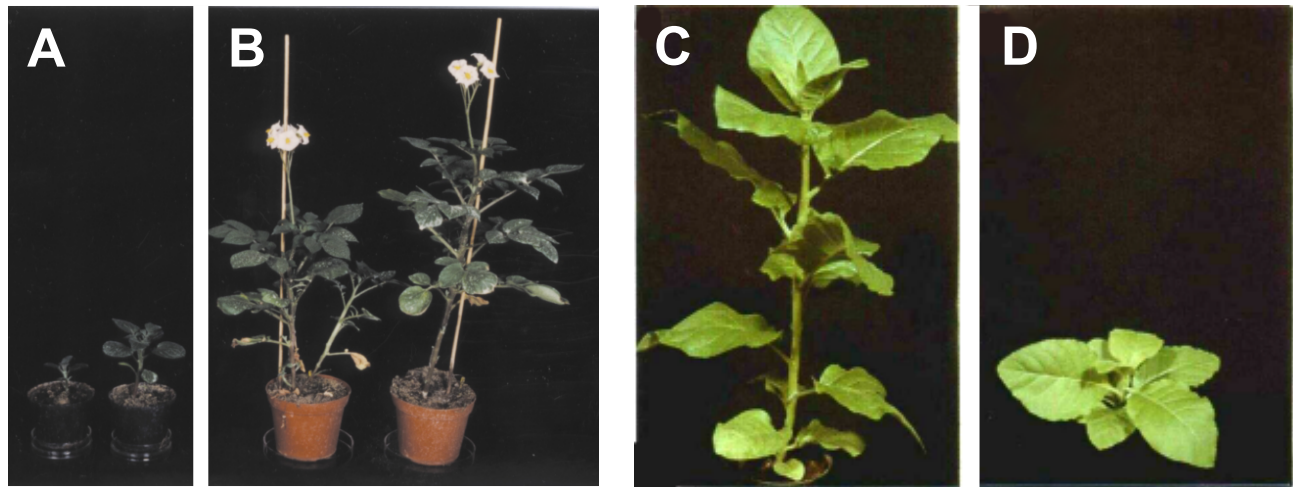
#### 3.3.1 Las pirofosfatasas solubles inorgánicas

En 1969, se publicó un trabajo en el que se analizó la actividad PPasa de fracciones solubles en raíces de *Vicia faba* var. *Minor* (haba), mismas que habían sido expuestas a deficiencia de boro. En este trabajo, se observó una disminución de la actividad PPasa como resultado de los cambios fisiológicos o morfológicos en la raíz producto de la deficiencia del boro. Además, se observó que la actividad era mayor en la punta de las raíces y disminuía hacia arriba en la raíz (Hinde y Finch, 1966). De esta manera, quedaba documentado uno de los primeros experimentos que resaltaban la importancia de la actividad PPasa para las plantas. Posteriormente, se identificó una pirofosfatasa en el cloroplasto de las hojas del maíz y se demostró que los niveles de actividad de esta enzima dependían de la cantidad de luz proporcionada (Simmons y Butler, 1969), siendo la luz roja más efectiva que la luz blanca y que la luz roja lejana. Estos efectos y el hecho de que la luz en el rojo lejano reviertan los efectos de la luz roja indicaban que la síntesis de la PPasa en el cloroplasto del maíz era controlada por el sistema reversible del fitocromo (Butler y Bennett, 1969). La observación de que la cicloheximida 10 $\mu$ L inhibía completamente la respuesta a la irradiación indicaba un proceso de síntesis de la PPasas más que de actividad (Butler y Bennett, 1969).

En los años 90, se investigaron los niveles de metabolitos y carbohidratos en las hojas del tabaco (*Nicotiana tabacum*) y en las hojas y los tubérculos de la papa (*Solanum tuberosum*) que habrían sido transformadas con la pirofosfatasa de *Escherichia coli* bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. En el tabaco, las hojas contenían de dos a tres veces menos PPI que las plantas control y se observó un gran incremento de la UDP-glucosa, de la sacarosa, de las hexosas y del almidón, pero los niveles de los azúcares solubles resultaron más altos que los del almidón (Jelitto *et al.*, 1992 Sonnewald, 1992). Además, el crecimiento de los tallos y raíces fue inhibido. En las papas, las hojas contenían de dos a tres veces menos PPI y niveles altos de UDP-glucosa en relación con la hexosa-P; la sacarosa se incrementó y el almidón disminuyó; las plantas producían un gran número de tubérculos pequeños que contenían más sacarosa y menos almidón (Sonnewald, 1992c). Los tubérculos contenían tres veces más UDP-glucosa, tres veces menos hexosa-P, glicerato-3-P, fosfoenolpiruvato y

arriba de seis veces más de fructosa-2-6-bifosfato, que las plantas silvestres (Geigenberger *et al.*, 1998). Con estos resultados se concluyó que la remoción del PPi del citosol inhibía el crecimiento de las plantas y generó evidencia de que la movilización de la sacarosa, vía la sacarosa sintasa, requiere del PPi, que es necesario para un crecimiento robusto, aunque no indispensable para la sobrevivencia de la planta (Jelitto *et al.*, 1992, Sonnewald, 1992; Geigenberger *et al.*, 1998; Farré, *et al.*, 2006). Por el contrario, otros experimentos que también usaron tubérculos de papa que expresaban a la pirofosfatasa de *Escherichia coli*, pero bajo el control del promotor específico de la patatina, mostraron un crecimiento significativo y acelerado (Figuras 6A y 6B), además de un período de latencia acortado entre seis a siete semanas, respecto del observado en los tubérculos de las plantas silvestres (Farré *et al.*, 2001).

En otro estudio realizado con el propósito de conocer el efecto del PPi en el transporte a través del floema en plantas de tabaco, se introdujo la PPasa, utilizando también al gene de *E. coli*, bajo un promotor de *Agrobacterium rhizogenes* que actúa específicamente en el floema (Lerchl *et al.*, 1995). En este caso, las plantas mostraron un crecimiento reducido, comparadas con las plantas control (Figura 6C y 6D), una disminución del contenido del PPi, pérdida de la clorofila, una acumulación de azúcares en las hojas fuente y un retraso en su crecimiento. El análisis indicó que la disminución del PPi en el floema aumenta el contenido de almidón y reduce los azúcares solubles en las hojas (una reducción en el cociente sacarosa/almidón), con una disminución en el cociente ATP/ADP, concluyendo que el PPi es esencial para el transporte de la sacarosa a largas distancias (Lerchl *et al.*, 1995). Además de estos experimentos, las plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan la PPasa de *E. coli* de forma constitutiva mostraron menor crecimiento, tasas menores de fotosíntesis y niveles altos de glucosa y fructuosa, pero sin cambios en la acumulación de sacarosa y almidón, ni en la cinética de germinación (Lee *et al.*, 2005). Todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia del PPi en la integración del metabolismo primario entre los tejidos fuente y demanda, así como el control de los flujos de carbono en las plantas superiores.



**Figura 6. Efectos fenotípicos en plantas de papa (A) y (B), y en plantas de tabaco (C) y (D) que sobreexpresan la pirofosfatasa de *E. coli*. Las plantas de papa control (A) son más pequeñas que las plantas transgénicas (B) que presentan un mayor crecimiento después de 18 semanas. Las plantas de tabaco control (C) muestran un tamaño mayor comparadas a la planta transgénica que presenta un tamaño reducido (D). Las imágenes de las plantas de papa fueron tomadas del trabajo reportado por Farré *et al.*, (2001) y las de tabaco por el de Lerchl *et al.*, (1995).**

En *Papaver rhoeas* (amapola) dos PPasas participan en los mecanismos de rechazo del polen incompatible. Estas proteínas sufren *in vivo* una fosforilación dependiente de calcio (Rudd *et al.*, 1996) y este proceso provoca inhibición de su actividad, estableciendo un nuevo mecanismo de regulación de las PPasas de las plantas. Estos resultados muestran evidencia de la participación de las PPasas en la germinación y el crecimiento del tubo polínico y de su relevancia en la respuesta de auto incompatibilidad en esta especie (de Graaf *et al.*, 2006). Cabe aclarar que los mecanismos de auto incompatibilidad observados en Papaveraceae, difieren de los que se han encontrado en Rosaceae y Solanaceae.

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene seis pirofosfatasa inorgánicas solubles clásicas (<http://www.arabidopsis.org>); AtPPasa1 a la 6) y al menos una parece ser plastidial (AtPPasa6; Schulze, *et al.*, 2004). El silenciamiento de la forma plastidial usando la tecnología de silenciamiento inducida por virus (VIGS; virus-induced gene silencing) generó plantas con niveles más altos de PPI, la disminución del contenido del almidón y alteraciones en la biosíntesis de la clorofila y los carotenos. En estas plantas sujetas al silenciamiento la asimilación de CO<sub>2</sub> se redujo aproximadamente en un 30%, con una disminución en la traducción de la Rubisco. Además, las plantas con baja actividad de la PPasa

presentaban una cierta marchitez, frente a la sequía moderada, que se correlaciona con niveles reducidos de ácido abscísico, lo que limita el cierre de los estomas (George *et al.*, 2010).

### 3.3.2 Las pirofosfatasa de protones

La importancia de la H<sup>+</sup>-PPasa en el tonoplasto de las células de las plantas superiores se ha documentado en una gran cantidad de reportes. En un primer trabajo en *Pyrus communis* (pera) se observó que los niveles de la H<sup>+</sup>-PPasa eran particularmente altos en los frutos jóvenes durante la etapa proliferativa (Shiratake *et al.*, 1997). Posteriormente, se demostró que la sobreexpresión de la H<sup>+</sup>-PPasa del tipo I en *Arabidopsis thaliana* resultaba en un aumento en la tolerancia a la sal y en una mayor resistencia de las plantas a la sequía (Gaxiola *et al.*, 2001). En dicho trabajo, la tolerancia a la sal se explicó por un incremento en la capacidad para introducir Na<sup>+</sup> en la vacuola y la resistencia a la sequía se atribuía a un aumento en la capacidad osmoreguladora de la vacuola (Gaxiola *et al.*, 2001). El aumento en la tolerancia a la sal y la sequía se ha corroborado en otros sistemas incluyendo *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Gao *et al.*, 2006) *Gossypium hirsutum* (algodón) (Pasapula *et al.*, 2011) *Medicago sativa* (alfalfa) (Bao *et al.*, 2009) *Zea mays* (maíz) (Li *et al.*, 2008) y *Agrostis stolonifera* (Agrostis) (Li *et al.*, 2010). Además, la sobreexpresión de la H<sup>+</sup>-PPasa de *Arabidopsis thaliana* o de *Thellungiella halophitla* provoca en las plantas un aumento en la biomasa de las raíces y de las hojas (Gaxiola *et al.*, 2012). Por ejemplo, en *A. thaliana* la producción de más hojas de roseta resultaba en un aumento significativo del área foliar (40-60 %) y los análisis indicaban que un mayor alargamiento de las hojas se debía a un incremento en el número de células (Li *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2010). En algodón, la sobreexpresión con la H<sup>+</sup>-PPasa de *Thellungiella halophitla* provocaba aumentos en la velocidad de la fotosíntesis, la conductancia estomatal y el desarrollo de las raíces comparado con las plantas silvestres, mientras que en las plantas que expresaban el mensaje en antisentido, estos parámetros resultaban reducidos de manera significativa (Lv *et al.*, 2008).

En condiciones de estrés por deficiencia de Pi las plantas de *Arabidopsis thaliana* eran capaces de inducir hasta cuatro veces la expresión de la H<sup>+</sup>-PPasa, tanto a nivel del mRNA como de la proteína (Yang *et al.*, 2007). La utilización de plantas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresoras de la AtH<sup>+</sup>-PPasa resultó en una ventaja en términos del desarrollo de las hojas y de las raíces en condiciones de bajo fósforo. Para estas plantas las raíces eran 2.5 veces más largas y 1.5 veces más densas que en las

plantas silvestres. Además, presentaban una fuerte capacidad de acidificar el medio en condiciones de estrés de Pi. Del mismo modo, en plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate) modificadas genéticamente y sobreexpresando la enzima E229D de la AtH<sup>+</sup>-PPasa que es más activa que la enzima silvestre y que se encuentra bajo la regulación del promotor 35S, se observó el desarrollo de brotes grandes, más raíces y mejores frutos que en las plantas control, cuando se cultivaron bajo deficiencia de Pi (Yang *et al.*, 2007). Esta mejora en los brotes y en la producción de los frutos sugiere que, en las condiciones ensayadas, los costos fisiológicos ocasionados por sistemas de raíces más grandes, no comprometen la productividad de la planta de tomate que sobreexpresa la AtH<sup>+</sup>-PPasa, ya que puede proveer de suficientes fotosintatos para soportar un desarrollo del fruto (Gaxiola *et al.*, 2012). Las plántulas de arroz transformadas con la misma mutante AtH<sup>+</sup>-PPasa E229D y crecidas en condiciones de bajo Pi, acumulaban 18% más Pi que el control. Además, la cuantificación de los ácidos orgánicos (citrato y malato) exudados por las raíces de dichas plantas transgénicas de arroz y tomate, se incrementaban alrededor del 60%, cuando se cultivaban en 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlPO}_4$ , mientras que en las plantas no modificadas, la aplicación del estrés no indujo este mismo nivel de exudados ácidos (Yang *et al.*, 2007).

### 3.4 El estrés de fósforo en las plantas

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos ya que es un componente estructural de las moléculas clave como el ATP, el PPi, los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, entre otros. Además, desempeña funciones importantes en las reacciones de transferencia de energía, participa en la cascada de transducción de señales y en la regulación de la actividad de proteínas (Marschner, 1995; Versaw, 2002). Aunque el P es abundante en la corteza terrestre, la disponibilidad del fosfato inorgánico (Pi) utilizable es a menudo limitante para la productividad de los cultivos (Marschner, 1995; Raghothama, 1999; Ticconi y Abel, 2004; Lin *et al.*, 2009), principalmente porque en el suelo el Pi se encuentra como compuestos orgánicos y/o en forma de compuestos inorgánicos insolubles, como fosfatos de hierro y aluminio en suelos ácidos o como fosfato de calcio, que es la forma dominante en suelos neutros o alcalinos. Estas formas no pueden ser usadas directamente por la planta (Marschner, 1995). Por ejemplo, el P orgánico debe ser escindido enzimáticamente, ya que la velocidad de hidrólisis no catalizada de los ésteres de fosfato es

extremadamente baja, debido a la elevada energía de activación de la reacción. A menudo, la disponibilidad es factor limitante para el crecimiento de las plantas en muchos suelos (Barber *et al.*, 1963), pues, en general, el Pi no está distribuido homogéneamente en los suelos y más del 80% se encuentra inmóvil y no está disponible fácilmente para las raíces (Holford, 1997). Desafortunadamente, el P aplicado como fertilizante se combina con otros compuestos en el suelo, lo que reduce su disponibilidad. Así la biodisponibilidad del P puede considerarse menos del 0.1% del total del P presente en el suelo (Khan *et al.*, 2010). Dado que la concentración de Pi en solución en el suelo esta entre 1 y 2  $\mu\text{M}$  y raramente excede 10  $\mu\text{M}$  y la concentración de Pi celular que es mayor de 10 mM, las plantas deben adquirir el Pi con un gasto de energía importante (Mimura, 1999; Raghothama, 2000).

Las plantas han desarrollado una gran variedad de mecanismos adaptativos para sobrevivir y crecer en condiciones de disponibilidad limitada de Pi (Raghothama, 1999; Raghothama y Karthikeyan, 2005; Jain *et al.*, 2007). Dentro de estos mecanismos de adaptación podemos incluir: aumento en la secreción de ácidos orgánicos, inducción de transportadores de Pi de alta afinidad, RNAsas y fosfatasas (Lipton, *et al.*, 1987; Theodorou y Plaxton, 1993; Bariola *et al.*, 1994; Muchhal, *et al.*, 1996; Smith, *et al.*, 1997; Abel *et al.*, 2002 Poirier y Bucher, 2002). En *Lupinus albus* (altramuz blanco) la deficiencia de Pi promueve la formación de raíces proteoides (Johnson *et al.*, 1994; 1996) y aumenta la abundancia y la actividad de las enzimas ATPasa del tipo P (Yan *et al.*, 2002) debido a un cambio postraduccional que implica la unión de la proteína 14-3-3 (Tomasi *et al.*, 2009). Adaptaciones adicionales incluyen una alteración en la velocidad de la fotosíntesis y en la partición de los fotosintatos la acumulación de antocianinas y la utilización de rutas alternas de la glucólisis o de la respiración, las cuales se han demostrado en *Brassica nigra* (mostaza negra) (Duff, *et al.*, 1989). En *Arabidopsis*, la ausencia de fósforo afecta el crecimiento de las raíces primarias, la elongación de las raíces laterales (Williamson *et al.*, 2001; Linkohr *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2002) y las plantas son más sensibles a las auxinas (López-Bucio *et al.*, 2003).

Las plantas requieren de varios sistemas de transporte para mediar la adquisición del Pi de los diversos ambientes y para permitir su subsecuente transporte a todas las células y compartimentos subcelulares (Bielecki, 1973; Marschner, 1995). La adquisición del Pi en las células está mediada por una familia de transportadores de Pi de alta y de baja afinidad, localizados en la membrana plasmática (Muchhal *et al.*, 1996; Raghothama, 1999; Chiou y Lin, 2011; Poirier y Bucher, 2002). Inicialmente, el

Pi es transportado dentro de las células de la epidermis de las raíces y, posteriormente, cargado en el xilema, para su distribución a la parte aérea de la planta. Bajo condiciones de deficiencia de Pi, el Pi puede ser redistribuido de los brotes a las raíces vía floema (Mimura, 1999; Raghothama, 1999). Además del transporte a través de la membrana plasmática, la vacuola intercambia Pi con el citoplasma, en un proceso que desempeña una función esencial en el control homeostático de su concentración en el citosol (Mimura, 1999). Los estudios bioquímicos y moleculares han revelado un sistema de rescate conservado en las plantas que se induce por la falta de Pi (Abel *et al.*, 2002). Dicho sistema incluye además de los transportadores de Pi, a las ribonucleasas, a las enzimas glucolíticas y anapleróticas, como la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la fosfofructocinasa dependiente de PPi (Abel *et al.*, 2002), a los factores transcripcionales (Rubio *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2005; Devaiah *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009), a los mRNAs no codificantes (Shin *et al.*, 2006), a los microRNAs (Kuo y Chiou, 2011) y a una gran cantidad de otros genes (Lin *et al.*, 2009; Chiou y Lin, 2011). De hecho, en *Arabidopsis* se ha reportado la inducción coordinada de más de 600 genes por la falta Pi (Misson *et al.*, 2005).

Con el uso de estrategias de genética reversa se han podido identificar varios factores transcripcionales importantes en las vías de señalización del Pi, incluidos los miembros de las familias de MYB, WRKY, y bHLH. PHR1 de *Arabidopsis* una proteína (R2R3 MYB) y a su homólogo PS1 (*Phosphorus starvation response 1*) de *Chlamydomonas reinhardtii* (Wykoff *et al.*, 1999) siendo los factores transcripcionales implicados en la respuesta de estrés por fósforo los mejor caracterizados. PHR1 se considera como un integrador central en la regulación del Pi a nivel de la transcripción (Chiou & Lin, 2011) y las mutantes *phr1* se caracterizan por tener menos Pi en los brotes, comparadas con las plantas silvestres. La sobreexpresión de PHR1 en *Arabidopsis*, o de su ortólogo OSPHR2 en el arroz (Zhou *et al.*, 2008), resulta en la acumulación excesiva de Pi. La ruta de señalización de PHR1 se muestra en la Figura 7. El fósforo es detectado localmente o sistémicamente por moléculas desconocidas y provoca la relocalización de PHR1 al núcleo por sumoilación mediada por una ligasa SUMO E3 (SIZ1; Rubio *et al.*, 2001). El dímero de PHR1 en el núcleo reconoce la secuencia palindrómica imperfecta GNATATNC presente en la región promotora de genes involucrados en la movilización del Pi (fosfatasas y ribonucleasas), el transporte y la homeostasis, así como también de genes para la biosíntesis de antocianinas (Rubio *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2007; Stefanovic *et al.*, 2007; Ribot *et al.*, 2008).

De la vía de señalización mediada por PHR1 se han caracterizado tres genes; At4, miR399 y PHO2/UBC24. At4 es un gen que pertenece a la familia IPS1 (*Induced by Phosphate Starvation1*) que se induce por bajos niveles de pi, es regulado positivamente por phr1 y se caracteriza por carecer de un marco de lectura abierto largo. En su lugar, contiene una serie de pequeños marcos de lectura (Liu *et al.*, 1997; Martín *et al.*, 2000). At4 desempeña una función importante en el control de la translocación del Pi de las raíces a la parte aérea (Burleigh y Harrison 1999; Shin *et al.* 2006). De la misma manera que At4, el precursor del micro RNA 399 (miR399) es regulado positivamente por PHR1 y es procesado por la RNAasa Dicer-like 1 (DCL1) una proteína argonauta (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). En condiciones de estrés por bajos niveles de P, el miR399 es translocado por el floema a las raíces en donde reconoce y degrada a su mRNA blanco, que codifica para PHO2/UBC24, una conjugasa de ubiquitina E2 (Fujii *et al.*, 2005; Aung *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006). El transportador de alta afinidad PHT1 está entre los blancos que son marcados para degradación por PHO2, por lo que el miR399 evita la acumulación de PHO2 y se traduce en una acumulación de PHT1 en la membrana de las células, durante el estrés por bajo P en las plantas. En este circuito, la actividad del miR399 es regulada negativamente por At4 mediante un mecanismo que parece tener lugar sólo en plantas y que se conoce como mimetización del blanco (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). Una región dentro de la secuencia de At4 es complementaria al miR399, pero el proceso de degradación no se completa, debido a un bucle en el sitio de corte para Dicer-like1. Así At4 secuestra al miR399 previniendo la degradación de su blanco original, PHO2. Este intrincado mecanismo permite la regulación transitoria de PHO2 por el miR399 durante el estrés por bajo Pi, facilitando una rápida respuesta a la deficiencia, además de un rápido retorno al estado normal cuando la concentración de Pi se restablece, lo que evita la toxicidad por acumulación de Pi (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007).



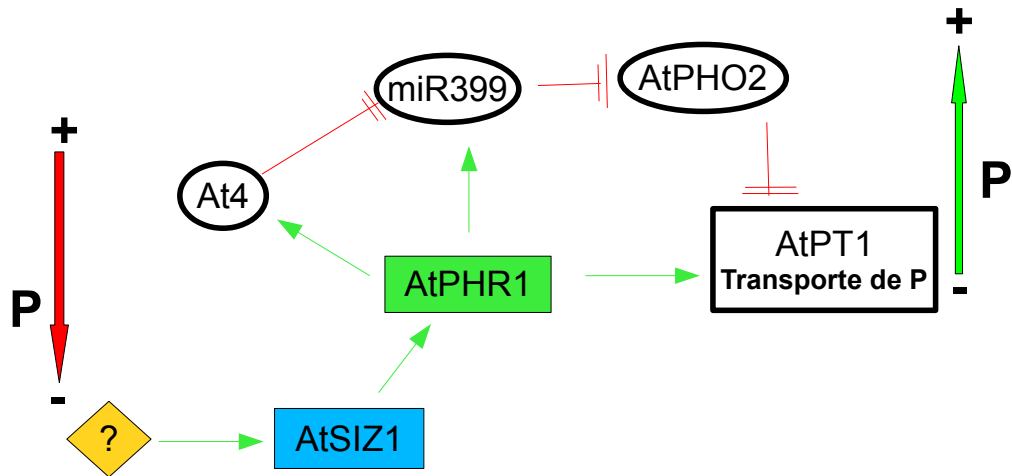


Figura 7. Regulación de la adquisición de fosfato por la ruta de PHR1 en *Arabidopsis thaliana*. Las flechas verdes indican regulación positiva y las barras rojas indican regulación negativa. Un sensor desconocido (rombo naranja) reconoce la falta de Pi y activa a AtSIZ1 (rectángulo azul) y provoca la sumoilación en AtPHR1 (rectángulo verde) que a su vez activa la expresión de At4, el microRNA 399 (miR399) y estimula la expresión de los transportadores de Pi.

## 4 Hipótesis

Los niveles de los mRNAs, y/o la actividad de las pirofosfatasa inorgánicas de *Phaseolus vulgaris* cambiarán en respuesta al estrés por deficiencia de fósforo, siendo además, dicha respuesta tejido específica.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo General

Caracterizar los mRNAs y la actividad de las pirofosfatasa de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés por deficiencia de fósforo

### 5.2 Objetivos Particulares

- Identificar todas las secuencias posibles de los mRNAs que codifican para las PPasas solubles de frijol (*Phaseolus vulgaris*).
- Hacer una caracterización fisiológica y molecular de las plantas de frijol sometidas a estrés por ausencia de fósforo.
- Determinar el patrón de expresión de los genes que codifican para las PPasas en varios tejidos de plantas de frijol sometidas a estrés por ausencia de fósforo.
- Mediante la técnica de secuenciación masiva determinar la expresión de las PPasas y estudiar el transcriptoma de las hojas H3 y H5 en condiciones control y en deficiencia de fósforo.
- Medir la actividad de las PPasas en varios tejidos de las plantas de frijol durante la deficiencia de fósforo.

## **6 Materiales y Métodos**

### **6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento de las plantas**

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* (cv. Pinto Villa) se desinfectaron con una disolución al 3% de hipoclorito de sodio y al 0.1% de tween 20 durante 10 minutos y se lavaron con agua desionizada estéril para eliminar el hipoclorito. Las semillas fueron puestas en toallas de papel estériles, humedecidas con agua desionizada y colocadas en una charola dentro de una incubadora. La germinación y el crecimiento se continuó por cuatro días a una temperatura entre 26 y 28°C. Posteriormente, las plántulas se sembraron y crecieron en agrolita en un invernadero, iluminadas con luz natural y regadas con la disolución de nutrientes reportada por Estrada-Navarrete y colaboradores (2007) de la que sólo se modificó la concentración de fosfato ajustándose a 1 mM final. Las plantas en ausencia de fósforo fueron regadas dos semanas con la disolución completa en nutrientes y tres semanas con una solución sin fosfato, mientras que las plantas control se crecieron por cinco semanas con el medio completo.

### **6.2 Fotografías de las hojas en condiciones de ausencia de fósforo y control**

Las fotografías de las hojas y de los discos de hojas fueron capturadas con la ayuda de una cámara de 5.1 mega pixeles (SONY™) agrupando en una sola foto todas las hojas (H1 a H5) de ambos tratamientos. Para cada conjunto (hojas control y hojas en deficiencia de fósforo), se mantuvieron las mismas condiciones de iluminación con ayuda de un reflector. Para evitar inestabilidad y que la fotografía saliera movida, la cámara se monto en un tripié y el disparo se realizó usando la opción de disparo automático de la cámara.

### 6.3 Determinación del índice SPAD y del contenido de agua

La determinación del índice SPAD (contenido de clorofila, como unidad relativa) se realizó en las distintas hojas *in situ* usando un medidor de clorofila (SPAD-502, Konica-Minolta™). El contenido de agua (u) se calculó usando la ecuación 1 y el peso seco se obtuvo luego de la deshidratación de las hojas y las raíces, en un horno a 65°C por 48 horas.

$$\text{Ec. 1} \quad u = \frac{P_f - P_s}{P_f} \times 100$$

en donde  $P_f$  es el peso fresco y  $P_s$  es el peso seco.

### 6.4 Cuantificación de los pigmentos

Para la cuantificación de los pigmentos fotosintéticos, discos de aproximadamente 1.5 cm de diámetro se cortaron de las distintas hojas y se molieron con la ayuda de un mortero y pistilo con dos mL de acetona fría al 80 % (-20°C). Las muestras se colectaron en tubos de 2 mL y se centrifugaron a 16000 x g por 10 min a 4°C. Se emplearon alícuotas de 100 µL para la determinación. Los espectros de absorción en luz visible se registraron de 350 a 700 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Optizen Pop Mecasys™). Los carotenoides, clorofila a y clorofila b se determinaron a la longitud de onda de 470, 663, y 646 nm, respectivamente.

### 6.5 Determinación del contenido de fósforo

El contenido de fósforo se determinó en hojas, raíces y tallos de plantas +P y -P. Para ello, los tejidos se pulverizaron con mortero y pistilo en presencia de N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, las muestras se liofilizaron y almacenaron a -20°C. El contenido total de fósforo se determinó usando un protocolo modificado del método reportado por Patterson y Pappenhangen (1978). Un miligramo de tejido liofilizado se colocó en un tubo de ensayo (previamente lavado con agua desionizada) y se le agregaron 100 µL de una disolución al 95 % (v/v) de etanol conteniendo 10 % (p/v) de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y 1% (v/v) de

HClO<sub>4</sub>. Las muestras se evaporaron a sequedad a 90°C y se calcinaron directo a la flama en un mechero, para completar la oxidación. Después de enfriar, los residuos se disolvieron en 300 µL de HCl 0.5 M, se evaporaron a sequedad y se disolvieron en 300 µL de agua desionizada. El contenido de fósforo se determinó con la ayuda de una curva patrón elaborada con concentraciones de 0 a 20nmoles de fosfato, en placas multipozo usando entre 20 y 50 µL de muestra, 200 µL del reactivo de verde de malaquita (ver abajo) y agua para completar a 250 µL. La absorbancia a 450 nm se registró en un lector de placas BioRad™ modelo Benchmark.

## 6.6 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

El RNA total se extrajo de tejido fresco (100-400 mg) con TRI Reagent (Ambion™). Para inactivar las RNAsas el agua se trató con dietilpirocarbonato al 0.1% y se utilizó material desechable libre de RNAsas. La pureza del RNA se determinó midiendo la relación de absorbancias entre 260/280 nm y su integridad se confirmó por electroforesis en geles de agarosa conteniendo formaldehído. La cantidad de RNA en cada una de las muestras se confirmó densitométricamente usando el equipo *Carestream Molecular Imaging Software* (Kodak™). Para eliminar posibles contaminantes de DNA las muestras (1µg total RNA) se trataron con DNasa I (*amplification grade* de Invitrogen™). La DNasa se inactivó por la adición de 1 µL de una solución 25 mM EDTA y las muestras se calentaron por 10 min a 65°C. Inmediatamente después, se llevó acabo la reacción de síntesis del cDNA usando el estuche SuperScript III (Invitrogen™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 6.7 Identificación de las secuencias de los mRNAs de las pirofosfatasas

La técnica 3'RACE se realizó usando el estuche de 3'RACE (*system for rapid amplification of cDNA ends* de Invitrogen™) y con oligonucleótidos diseñados a partir de alineamientos de las secuencias de los mensajeros para las pirofosfatasas de *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Papaver rhoeas* y *Populus trichocarpa*. Los productos de los experimentos 3'RACE fueron clonados en el vector pGEM-t-easy (Promega™) y posteriormente secuenciados en la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias fueron analizadas y comparadas con BioEdit (Hall,

1999) y Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009) y los análisis bioinformáticos de la predicción de el punto isoeléctrico, masa molécula y, posibles péptidos señal se realizaron con la ayuda de los programas *Compute pI/Mw tool*, *SignalP 4.0 Server* y *ChloroP 1.1 Server*, disponibles en la pagina del ExPASy (<http://expasy.org/tools/>).

## 6.8 Construcción de los arboles filogenético

Las secuencias de proteínas para las PPasas se obtuvieron de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se alinearon usando el programa PSi-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:psicoffee>) que es más lento que Clustal, pero generalmente produce alineamientos más precisos (Di Tommaso *et al.*, 2011). Los arboles filogenético se construyeron por el método de Maximum Likelihood y la confianza del orden de las ramificaciones se verificó con el método Bootstrap con 500 replicas usando el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

## 6.9 Diseño de los oligonucleótidos para el PCR cuantitativo

El diseño de los oligonucleótidos se realizó usando el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) empleando los siguientes parámetros: un tamaño de producto de entre 60 y 150 pb, tamaño del oligonucleótido de entre 18 y 24 pb, % de GC entre 45 y 55 %, temperatura de hibridación ( $T_m$ ) de 58 a 62°C y un mínimo de estructura secundaria. El tamaño de los productos y su integridad se revisaron en geles de agarosa al 3 % y su eficiencia para su uso en la técnica de PCR cuantitativa se estimó construyendo curvas de dilución (100 a 0.01 ng).

## 6.10 Condiciones y análisis de los mensajeros por PCR cuantitativo

Los ensayos de PCR cuantitativo se realizaron en un equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) usando el reactivo SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™). La reacción de PCR contenía 10  $\mu$ L of SYBR Green PCR Master Mix, 2  $\mu$ L (50 nM) de los oligonucleótidos y 8  $\mu$ L (10 ng) de cDNA en un volumen total de 20  $\mu$ L. Las mediciones del PCR cuantitativo se llevaron a cabo usando el siguiente protocolo: 50°C durante 2 min; 90°C durante 10

min; 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min. Se continuó con el protocolo de disociación (95°C durante 15 segundos), seguido de una disminución en la temperatura hasta 60°C durante 15 segundos y el calentamiento final de las muestras a 95°C por 15 segundos. Este paso final se realizó para verificar la presencia de sólo un producto de amplificación para cada par de oligonucleotidos. Los datos se analizaron con el programa LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009) y la expresión relativa se calculó usando la ecuación 2 (Pfaffl, 2004)

$$\text{Ec. 2} \quad R = \frac{E_{control}^{Ct_{gen}}}{E_{tratamiento}^{Ct_{gen}}} \div \frac{E_{control}^{Ct_{calibrador}}}{E_{tratamiento}^{Ct_{calibrador}}}$$

donde  $E_{control}$  y  $E_{tratamiento}$  son las eficiencias de las reacciones de PCR para las plantas +P y -P, respectivamente.  $Ct_{calibrador}$  se refiere a los datos de amplificación para el gen de referencia, usado para normalizar y  $Ct_{gen}$  corresponde a los datos de amplificación por PCR para el gen bajo estudio. Los datos presentados en este trabajo fueron el promedio de tres experimentos independientes y corridos por triplicado. En la sección de resultados los datos fueron graficados como el log (R), donde un valor cero indica que no hubo cambios en la expresión, valores positivos indican un incremento y valores negativos indican una disminución en la expresión. El error estándar de la media para la transformación logarítmica, se estimó usando la ecuación 3.

$$\text{Ec. 3} \quad \frac{s.e. \ln 2}{\bar{x}}$$

donde *s.e.* es el error estándar de la media para la variable no transformada y  $\bar{x}$  es la media.

Para normalizar los datos se utilizó el gen PvTIP41-like y su secuencia se obtuvo de la base de datos para *P. vulgaris* del Gen Index Project database (PhvGI: TC15259). El homólogo de este gen en *A. thaliana* (AtTIP41-like) se reportó como un gen de expresión constante en condiciones de bajo fósforo (Czechowski *et al.*, 2005). De manera adicional, la estabilidad de PvTIP41-like, PvActina EF1 $\alpha$  se analizaron usando el programa geNORM v3.5 (Vandesompele *et al.*, 2002).

## 6.11 Extracción de la proteína soluble

El tejido se homogeneizó en un mortero con ayuda de un pistilo usando una disolución de extracción que contenía 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 3 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA, 5 mM de 2-mercaptoetanol, 2 mM KCl, 1 % polivinilpirrolidona, 15 % glicerol, 0.05 % tween 20, 1 % de arena de mar calcinada (Merck™) y 2.0 mg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, a 4°C. El extracto se centrifugó a 16,000 x g por 10 min. a 4°C. El sobrenadante se diluyó con la misma solución de Tris 1:5 veces (v/v) y se realizó el ensayo de la actividad enzimática.

## 6.12 Ensayos de la actividad de las pirofosfatasas

### 6.12.1 Ensayo de la actividad total de las pirofosfatasas dependientes de $Mg^{2+}$

El ensayo de actividad se realizó en una placa de 96 pozos, empleando 40  $\mu$ L (hojas) ó 30  $\mu$ L (raíces y tallos) de una mezcla que contenía 100 mM de Tris/HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 3mM  $MgCl_2$  y 400  $\mu$ M PPI. La reacción se inició con la adición de 10  $\mu$ L de proteína cuando los extractos provenían de hojas ó 20  $\mu$ L cuando se utilizaron raíces y tallos. Finalmente, después de 10min de incubación a 25°C, la reacción de hidrólisis de PPI se detuvo por la adición de 200  $\mu$ L del reactivo de verde de malaquita, preparado como está descrito en el trabajo de Navarro de la Sancha y colaboradores (2007). La formación del Pi se midió a 595 nm en un lector de microplacas Benchmark (Bio-Rad). El Pi liberado en el ensayo control (en ausencia de  $Mg^{2+}$ ) se restó del correspondiente con  $Mg^{2+}$ . El ensayo de pirofosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  se expresó como  $\mu$ mol PPI hidrolizado  $min^{-1}$  mg de proteína<sup>-1</sup>. La concentración de proteína se determinó en microplaca usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad™) a 595 nm en un lector de microplacas Benchmark (Bio-Rad™) usando albúmina de suero bovino como estándar.



### 6.12.2 SDS-PAGE y electroforesis nativa

La electroforesis en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE) se realizó en geles Mini-protein TGX 12%T (Bio-Rad™), siguiendo el protocolo de Leammli (Gallagher, 2001). Las muestras que contenían los extractos totales de proteína (5 µg ó 10 µg por pozo, dependiendo del tejido a analizar) se calentaron por 5 min a 90°C y centrifugaron en minifuga. A continuación, las muestras se cargaron en los geles y la electroforesis se corrió a 100 V por 90 min. Para identificar las proteínas se utilizó el método de tinción con plata reportado por Echan y Speicher (2002).

La electroforesis en geles nativos se realizó usando geles de poli(acrilamida) de 1 mm de espesor y con un gradiente de poro 4 a 15%T (T es la concentración total de monómeros de acrilamida). El buffer se preparó como se recomienda en el protocolo de Leammli (Gallagher, 2001) pero en ausencia de SDS y agentes reductores (ditiotritol o 2-mercaptoetanol). Los geles se precorrieron por 30 min a 200V para eliminar los contaminantes producto de la reacción de polimerización (TEMED, persulfato de amonio o radicales libres) Los geles se cargaron con 5 µg ó 10 µg de proteína por carril y se corrieron a 125 V por 4 horas. Al final de la corrida, la actividad de pirofosfatasa se ensayó *in situ* como se describe a continuación: Los geles se incubaron con agitación suave, por 30 min en disolución Tris/HCl pH 7.4, con 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 150 µM de PPI. Inmediatamente, los geles se lavaron con agua desionizada y se tiñeron con 10 mL del reactivo verde de malaquita, preparado como se describe en el trabajo de Navarro de la Sancha y colaboradores (2007).

### 6.13 Secuenciación masiva y ensamblado del transcriptoma de las hojas H5 de frijol en condiciones de deficiencia de fósforo

Para realizar el análisis de la expresión de los mensajeros mediante secuenciación masiva (RNAsec) se extrajo el RNA total (como se describe en apartado 6.5) de las hojas H5 y H3 de plantas en condiciones control y en ausencia de Pi. El RNA total se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. Posteriormente, en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA (UUSMD) de la UNAM, las muestras de RNA fueron usadas para sintetizar cDNA. La síntesis de cDNA se realizó en dos pasos:

(1) se sintetizó una de las cadenas de DNA usando la reversa transcriptasa y (2) se eliminó el RNA mediante digestión con una RNAsa y la cadena complementaria se sintetizó con la ayuda de la DNA Pol I. Posteriormente, las muestras de cDNA se procesaron usando la plataforma Illumina/Solexa para generar las secuencias del transcriptoma.

Para realizar el ensamblado de secuencia (transcriptoma) se utilizó la información de la base de datos "Common Bean Genome-scale Gene Space Sequencing via Methylation Filtration (CGB-ss-mf), [http://jeff.ifxworks.com/Legume/common\\_bean.html](http://jeff.ifxworks.com/Legume/common_bean.html)". Posteriormente, apareció una base de datos parcial del genoma de frijol generado por el Departamento de Energía de EUA en conjunto con el "Joint Genome Institute" (Phytozome 7; <http://www.jgi.doe.gov/>). La anotación, aunque incompleta, proviene de la comparación con el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Con esta base de datos se realizó un segundo ensamblado.

El ensamblado de los transcritos se realizó empleando la técnica de gráficas de *de Bruijn* (Zerbino y Birney, 2008), implementada en los programas VELVET y OASES. La comparación de lecturas individuales para cada transcrito en este programa se realiza mediante el alineamiento de secuencias con el algoritmo de Burrows-Wheeler (Li y Durbin, 2009). En estos programas, el resultado puede variar significativamente dependiendo de la longitud del gráfico (k) de *de Bruijn* que se elija, por ello, es necesario repetir el ensamblado con diferentes longitudes del gráfico y combinar los resultados en un ensamblado global, lo que garantiza obtener el mejor resultado posible.

## 7 Resultados

### 7.1 Caracterización de las plantas de frijol en condiciones de deficiencia de fosfato

Una disminución del contenido de fósforo produce cambios morfológicos en los tejidos (Poirier y Bucher, 2002) uno de nuestros objetivos fue realizar una caracterización de las plantas en condiciones de deficiencia de fósforo. Con tal propósito, se evaluaron varios parámetros relacionados con el estrés por ausencia de fósforo. El análisis se realizó en hojas, tallos y raíces de las plantas -P y +P. Los órganos se subdividieron dependiendo de su localización en la planta y una descripción más detallada de los tejidos analizados se muestra en la Figura 8.

Unos de los efectos mejor conocidos provocado por la deficiencia de fósforo y considerado como un signo de estrés, es el cambio de coloración de las hojas adquiriendo un tono verde más oscuro (Poirier y Bucher, 2002). Una comparación visual de las plantas -P y +P reveló variaciones en la coloración de las hojas dependiendo de la posición de la hoja en la planta y que se relacionaba con la edad del tejido. También, se observó una variación en el color de hoja entre plantas del mismo tratamiento. Sin embargo, las hojas más jóvenes (H4 y H5) de las plantas -P eran claramente más oscuras en color que las mismas hojas en las plantas +P (Figura 9). Las hojas intermedias H3 y H2 mostraron cambios sutiles y las hojas más viejas H1, las cuales podían presentar algunos signos de senescencia eran muy similares en su coloración en las plantas -P y +P. En este estudio, las hojas H1 que presentaron señales de senescencia no fueron consideradas para futuros análisis.

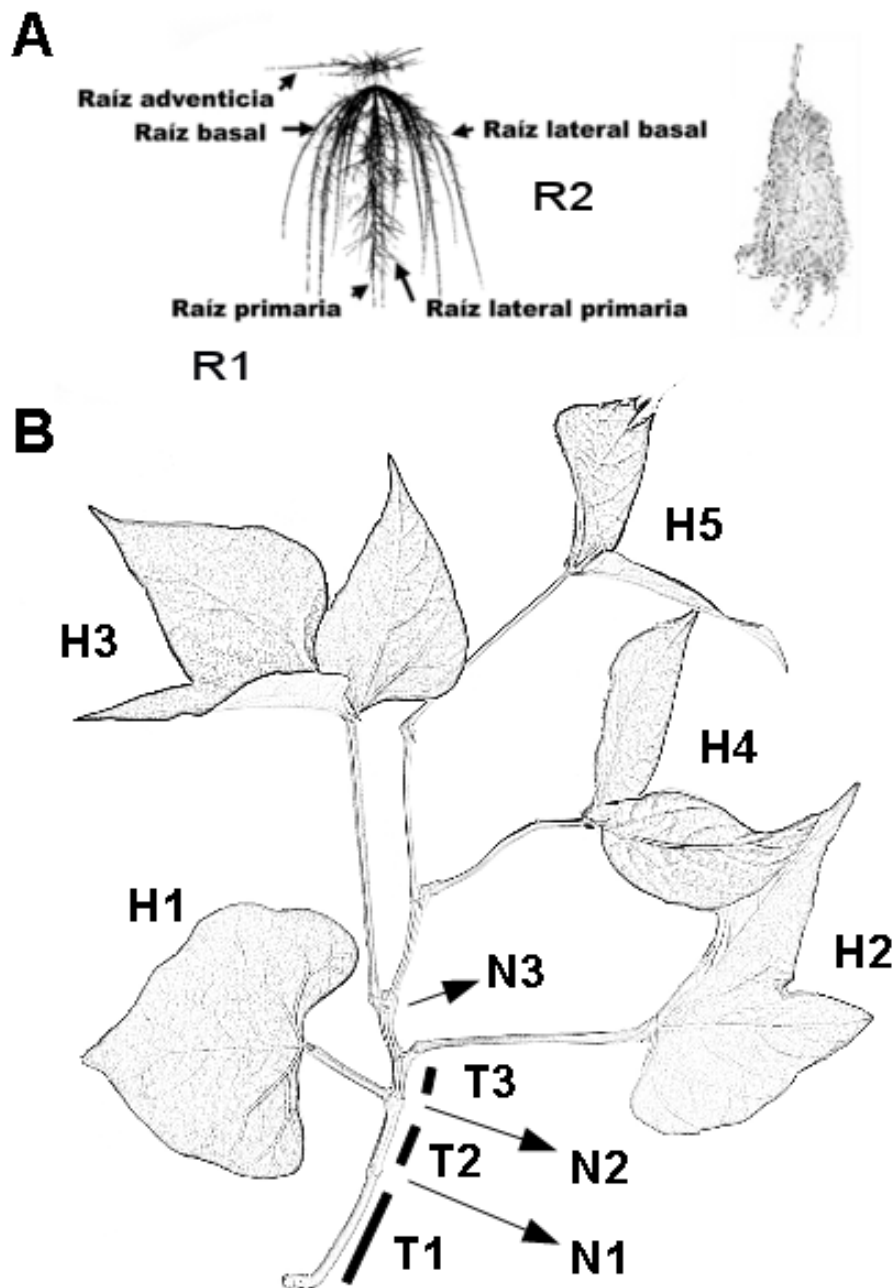


Figura 8. Clasificación de los tejidos de *Phaseolus vulgaris* (frijol común) de acuerdo con su posición en la planta, como se consideró en este estudio. (A) Representación esquemática de las raíces. Adaptada del trabajo de Rubio y colaboradores (2004). Dos grupos de raíces se utilizaron en este trabajo: El grupo R1 que incluía la raíz primaria y el grupo R2 incluyendo las raíces laterales. (B) Dibujo esquemático del tejido aéreo de plantas con 6 semanas de edad. Las hojas se enumeraron desde H1 para las hojas más viejas (inferior), emergiendo del nodo dos, hasta H5 para la hoja más joven (superior) dispuesta en el nodo seis. Las barras negras indican las secciones de tallos considerados en este estudio y corresponden a los internodos T1-T3. T1 es el internodo desde la raíz al nodo de los cotiledones (N1). La región del tallo después de N3 se ramifica y no fue considerada en este estudio.

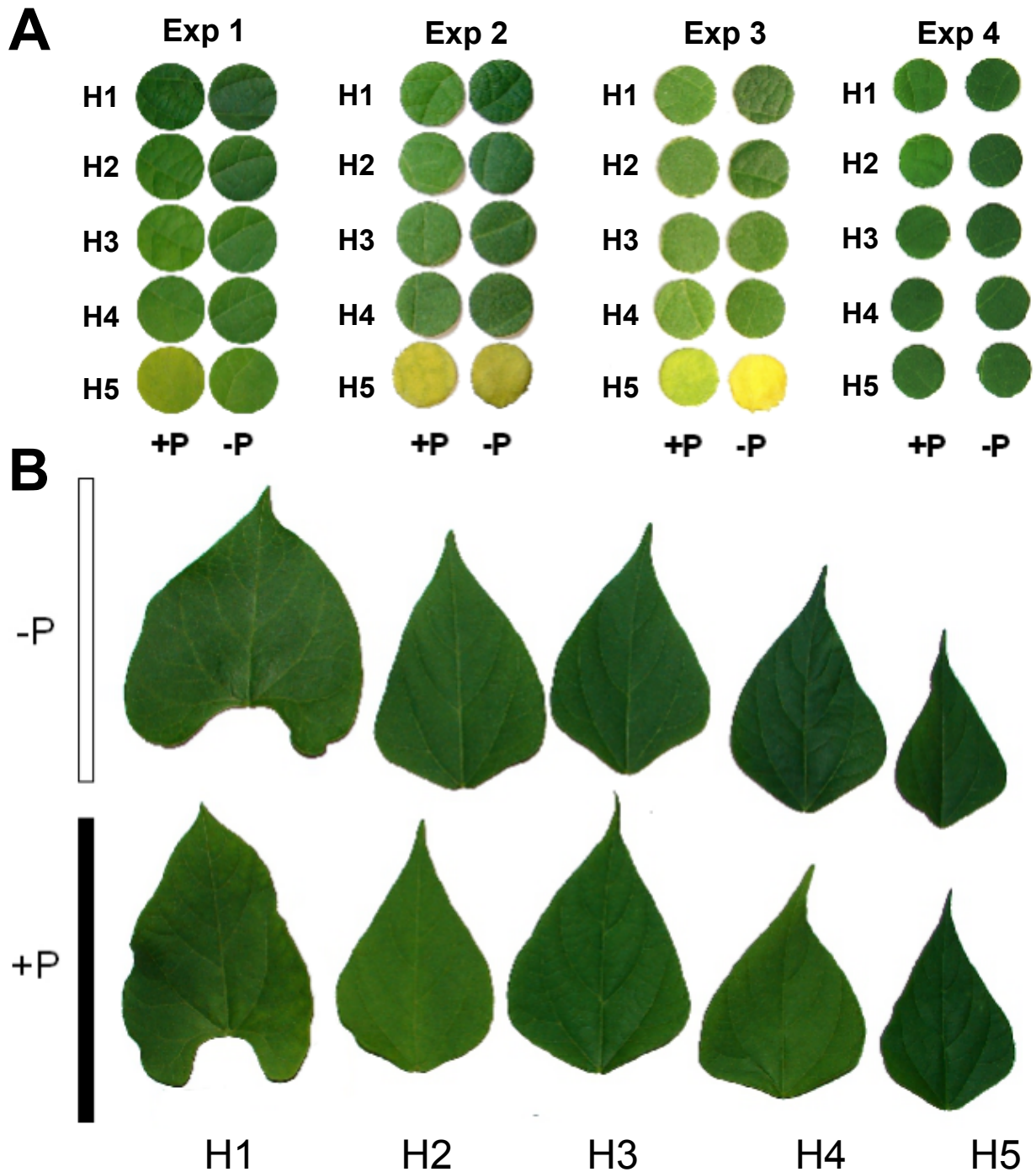


Figura 9. Efecto de la deficiencia de fosfato en las hojas de *Phaseolus vulgaris* (A) Cambios en el color de discos de las hojas de plantas de frijol en condiciones control (+ P) y en ausencia de fosfato (-P). Las hojas H1 son las más viejas y las H5 las más jóvenes (ver Figura 8). En algunos casos, las hojas H1 podían presentar signos de envejecimiento, este tipo de hojas no se incluyeron en este estudio. (B) Fotografías de las hojas H1-H5 de plantas de frijol con seis semanas de edad regadas con medio completo en nutrientes (+P) o con medio carente de fosfato durante las últimas 3 semanas (-P).

Para obtener medidas cuantitativas de los cambios en la coloración de las hojas de las plantas en ausencia de fósforo, se realizaron mediciones no destructivas del contenido de pigmentos con un medidor de clorofila SPAD-502. Este instrumento mide la absorbencia de la hoja en las regiones del rojo y del infrarrojo cercano y calcula el índice SPAD. De acuerdo con la prueba estadística de *t-student*, las hojas H3, H4 y H5 de las plantas -P mostraron un mayor índice SPAD, en comparación con sus hojas correspondientes en las plantas +P. Por el contrario, las hojas H1 y H2 no mostraron diferencias significativas en las plantas -P y +P (Tabla 1A). Además de la determinación del índice SPAD, se obtuvieron los espectros de absorción en la región visible (300nm a 750nm) de extractos (80% acetona) de hojas de plantas +P y -P (Figura Suplementaria 1). Los datos mostraron cambios significativos en la absorbancia para las hojas H3, H4 y H5 a 470, 663 y 646 nm (correspondientes a carotenos, clorofila a y b, respectivamente; Tabla 1C). El contenido de agua en las plantas control en condiciones de deficiencia de fósforo también se evaluó y los datos mostraron una disminución significativa de 2.0 y 2.5% en las hojas H4 y H5 respectivamente de las plantas tratadas con respecto a las plantas control (Tabla 1B). Aunque esta disminución fue significativa, no se consideró que el cambio fuese suficiente para pensar que las plantas -P se encontraban bajo déficit hídrico ya que plantas sometidas a estrés hídrico moderado pueden perder hasta 10% del contenido de agua (Vassey y Sharkey, 1989).

**Tabla 1. Efecto de la ausencia de fosfato sobre la humedad, contenido de clorofilas y carotenos en hojas (H) y raíces (R) de plantas de *Phaseolus vulgaris* (A) índice SPAD. (B) contenido de agua en (%). (C) Absorbancia UV-visible de carotenos (470), clorofilas a (663nm) y b (646) en extractos cetónicos (100mg de peso fresco/mL) \*Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre plantas -P y +P según la prueba de la *t* de Student.**

<b>A</b>	Índice SPAD (au)			<b>B</b>	
	-P	+P		-P	+P
H1	31.0 ± 4.2	30.9 ± 4.8	H1	91.9 ± 1.4	91.4 ± 1.4
H2	35.6 ± 3.7	34.9 ± 3.1	H2	89.7 ± 1.8	90.0 ± 1.8
H3 *	37.6 ± 2.9	34.0 ± 2.5	H3	88.6 ± 1.4	89.7 ± 1.4
H4 *	38.6 ± 2.4	32.1 ± 2.9	H4 *	87.6 ± 1.2	90.2 ± 1.5
H5 *	38.4 ± 2.9	31.3 ± 3.4	H5 *	85.0 ± 2.8	88.1 ± 2.6
			R	93.8 ± 0.8	94.1 ± 1.0

<b>C</b>	Absorbancia (AU)					
	470nm		663nm		646nm	
	-P	+P	-P	+P	-P	+P
H1	1.12 ± 0.10	1.00 ± 0.20	1.25 ± 0.21	1.14 ± 0.21	0.58 ± 0.09	0.50 ± 0.12
H2	1.34 ± 0.11	1.12 ± 0.10	1.58 ± 0.21	1.32 ± 0.11	0.72 ± 0.08	0.60 ± 0.10
H3 *	1.24 ± 0.11 *	1.02 ± 0.06	1.52 ± 0.09 *	1.20 ± 0.05	0.67 ± 0.08 *	0.51 ± 0.04
H4 *	1.61 ± 0.17 *	1.20 ± 0.07	1.91 ± 0.20 *	1.44 ± 0.06	0.88 ± 0.12 *	0.63 ± 0.04
H5 *	1.67 ± 0.16 *	1.44 ± 0.10	2.12 ± 0.17 *	1.67 ± 0.13	1.01 ± 0.14 *	0.75 ± 0.10

Los valores son la media ± d.e. Para el índice SPAD  $N \geq 20$ , para los datos de humedad  $N \geq 6$ , para los valores Absorbancia  $N \geq 3$ .

ua, unidades arbitrarias; UA, unidades de absorbancia.

Para complementar lo anterior, se midió el contenido de fósforo en las plantas +P y -P (Figura 10). En comparación con las plantas control y de manera similar con otros reportes (Liang *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2007; Juszczuk, 2001) las plantas -P mostraron una reducción en el contenido de fósforo. De manera interesante, la disminución en el contenido de fósforo en las hojas era dependiente de su posición en la planta. En las plantas crecidas en ausencia de fosfato, el contenido de fósforo se redujo sólo un 34 % para las hojas H5, en las hojas H3 hubo una disminución del 75 % y en las hojas restantes se observaron cambios intermedios. En las plantas -P el contenido de fósforo descendió entre un 33 % en la raíz R1 y 65 % en el tallo T1 en comparación con las plantas +P. Además, en los tallos y raíces no se encontró una dependencia del contenido de fósforo y su localización dentro de la planta, pero trabajos previos han demostrado diferencias en los flujos de fosfato, dependiendo del tipo de raíz (Wanke, 1998; Rubio *et al.*, 2004). Con los valores del contenido de fósforo se realizó un análisis de varianza para las plantas -P y +P. Los resultados del análisis se muestra en la Tabla Suplementaria 2 e indican diferencias estadísticamente significativas en el contenido de fósforo entre las plantas -P y +P debidas al tratamiento de estrés.

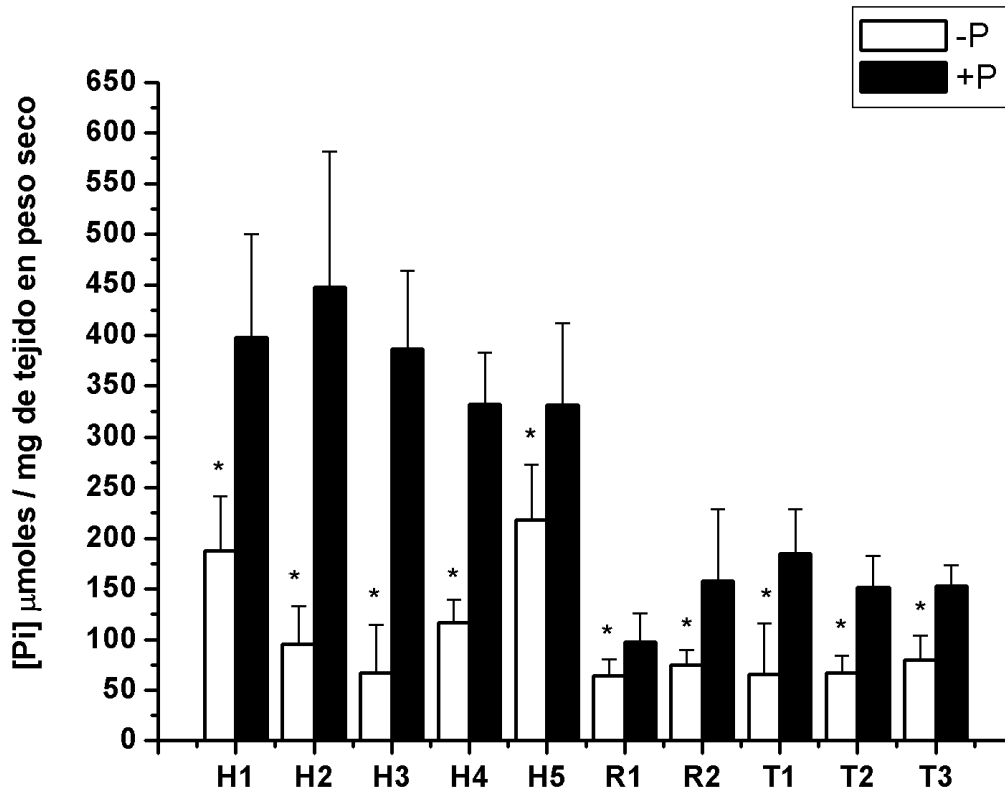


Figura 10. Análisis del contenido de fósforo en los diferentes tejidos de plantas de *Phaseolus vulgaris* en condiciones control (+P; 1 mM de fosfato) y bajo estrés por fosfato durante tres semanas (-P). Las hojas (H) se nombraron de acuerdo a su posición en la planta (también relacionado con su edad), H1 es la hoja inferior (más vieja) y H5 corresponde a la hoja superior (más joven). Las Raíces (R) se dividieron en dos grupos, raíz primaria (R1) y raíces laterales (R2). Los tallos (T) se separaron y analizaron de acuerdo a su localización en las plantas (ver Figura 8). Las barras blancas corresponden a las plantas deficientes (-P) y las barras negras a las plantas control (+P). Los valores son la media  $\pm$  error estándar con (N=6) experimentos independientes.

## 7.2 Identificación de las secuencias que codifican para las pirofosfatasa de *Phaseolus vulgaris*

En el genoma de *A. thaliana* se encuentran seis genes de pirofosfatasa. Sin embargo, en frijol la información disponible tanto del genoma como del proteoma está incompleta. Para encontrar las secuencias de los genes de las pirofosfatasa de frijol se usó la información disponible en la base de EST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y de TCs (*Tentative Consensus Sequences, from The Gen Index Project database* <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>). Se logró identificar tres secuencias y se clasificaron de acuerdo con su identidad con las pirofosfatasa de *Arabidopsis*: (PhvGI



Gene Index: TC22286), *PVPPA4* (PhvGI Gene Index: TC21741) y *PVPPA6* (GenBank ID: FE899103.1). Estas secuencias estaban incompletas y con el propósito de obtener la secuencia del cDNA con un marco de lectura abierto para las pirofosfatasa se aisló RNA total de plantas de frijol a partir del cual se sintetizó cDNA y se realizaron experimentos 3'RACE (rapid amplification of cDNA ends) utilizando oligonucleótidos para las regiones conservadas de los mensajeros que codifican las pirofosfatasa. Con estos experimentos se construyó una biblioteca 3'RACE y se identificaron las regiones 3'UTR de las PPasas previamente reportadas: *PVPPA1* (GenBank ID: HO703542), *PVPPA4* (GenBank ID: HO703550) y *PVPPA6* (GenBank ID: HO703543). Además, otros ESTs se reportaron: una pirofosfatasa de protones (*PVPPA1H<sup>+</sup>*), un activador de la transcripción dependiente de calmodulina (PvCAMTA), una ceto ácido reductoisomerasa, una poliproteína putativa designada como "tipo copia" y una proteína no caracterizada. Los números de acceso de estos ESTs se encuentran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Números de accesos de las secuencias 3'RACE encontradas y depositadas en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)**

dbEST_Id	User_Id	GenBank_Accn
71178664	PvPPa1_EST	HO703542
71178665	PvPPa6_EST	HO703543
71178666	PvCAMTA1_A_EST	HO703544
71178667	Copia_Type_EST	HO703545
71178668	PvPPaH+1_EST	HO703546
71178669	PvKaRlso_EST	HO703547
71178670	PvCAMTA1_B_EST	HO703548
71178671	Unk_001_EST	HO703549
71178672	PvPPa4_EST	HO703550

Las secuencias en nucleótidos y aminoácidos de las tres pirofosfatasa identificadas en este estudio se muestran en la Figura 11 y Figura Suplementaria 2, respectivamente. Los análisis bioinformáticos realizados predicen masas moleculares de 24.09 kD, 25.89 kD y 32.15 kD, y pI teórico de 5.72, 5.42 y 6.37 para *PVPPA1*, *PVPPA4* y *PVPPA6*, respectivamente. La pirofosfatasa PvPPA6 contiene un posible péptido de tránsito hacia el cloroplasto y comprende los primeros 54 aminoácidos. La proteína madura tiene una masa molecular teórica de 26.4 kD y un pI teórico de 5.00. Las tres pirofosfatasa identificadas, contienen la clásica secuencia de las pirofosfatasa dependientes de Mg<sup>2+</sup> (DXDXXDX), con tres residuos de aspártico formando el sitio de unión del ión bivalente esencial para la catálisis (Cooperman *et al.*, 1992).

10 20 30 40 50 60  
*PvPPa 1/1-642* .....  
*PvPPa 4/1-690* .....  
*PvPPa 6/1-867* 1 ATGGCGGCTACTAGAGCAATAACCATTGCGAGCAACTCCACCTGCACTCTACTTAGCAAGAAACCCCTTTG 70  
 80 90 100 110 120 130  
*PvPPa 1/1-642* .....  
*PvPPa 4/1-690* 1 ..... ATGGTTGAAACCGACATGGATACTGAAA 28  
*PvPPa 6/1-867* 71 TGGGTGGCACTTCTCTTTCCCTCGGCAACCTCAAATTTTGTGGACTAGGAGGTCTTACACCTGCAGGGC 140  
 150 160 170 180 190 200  
*PvPPa 1/1-642* 1 ..... ATGGCTCACCATGAAGATTCAAGTGCATGG ..... AATTCGGGTTTACCT ... CACCC 50  
*PvPPa 4/1-690* 29 CTGTTGCAAGTGAGGTTCCGTCAAAGGAGATCCAAACAATGTTCCCATCTCTCATCCTTCTTCGCATCC 98  
*PvPPa 6/1-867* 141 CATCTACAAATCCCCAGATTGTCTGTCAGGAGAAAGGCCAACCCGA ... AACCTCGACTATAGAGTTTCT 208  
 220 230 240 250 260 270  
*PvPPa 1/1-642* 51 TAAGCTCAA ... TGAAGAATAC TTTCTTCTGTCACGGAGAAC TGTGCTGCTCACCC TGGCATGA 116  
*PvPPa 4/1-690* 99 CCTCTTAA ... TGAAGGATTATTCATCCATGACCAGGAGATCTGTTGCTGCACACCCG TGGCATGA 164  
*PvPPa 6/1-867* 209 TTGTTGACAAATCTGGCAAGAAGGTTTC TCTTGGCATGATATTCATTGGGATCGGGTGATGATAT ... 275  
 290 300 310 320 330 340  
*PvPPa 1/1-642* 117 CTTAGAGATTGGACCAAGGAGCTCCATCAGTTTCAACTGTGTGGTTGAAATTGGCAAAGGCAGTAAGGTC 186  
*PvPPa 4/1-690* 165 CCTTGAGATAGGGCCTGGTGTCTCCGACAATCTTCAATTGTGTGGTTGAGATTGGGAAAGGAAGCAAGGTG 234  
*PvPPa 6/1-867* 276 CTTCAACTTTCATTGTTGAGATTCCTAAAGAATCAGTGCAAAGATGGAGTTGCCACCGATGAGGCTTTC 345  
 360 370 380 390 400 410  
*PvPPa 1/1-642* 187 AAGTATG ... AGTTGGACAAGAAAAGTGGACTCATAAAGGTTGATCGGATTCTTTACTC ... ATCTGTT 249  
*PvPPa 4/1-690* 235 AAATACG ... AACTGGATAAAAAATCGGGCTTATCAAGATCGACCGCTGCTTTACTC ... ATCAGTT 297  
*PvPPa 6/1-867* 346 ACTCCATAAAACAGGATACAAAAAAGGAAAGCTCCGATATTATCCCTATAATATACATTGGAAATTATG 415  
 430 440 450 460 470 480  
*PvPPa 1/1-642* 250 GTCTACCGCACAACCTATGGT ... TTTATCCCAAGAACCATTTG ... TGAGACAG 299  
*PvPPa 4/1-690* 298 GTGTATCCCTCACAACCTATGGT ... TTTATCCCAAGAACCATTTG ... TGAGACAG 347  
*PvPPa 6/1-867* 416 GCTTACCTTCACAAACATGGGAAGATCCATCTTTTGCAAACGCTGAAGTCGATGGAGCATTGGAGATAA 485  
 500 510 520 530 540 550  
*PvPPa 1/1-642* 300 TGATCCATGAGACGTGCTGGTTCTAATGCAGGAGCCCGTGTCTCTGTTCTTTCTTCTGCTGCGCC 368  
*PvPPa 4/1-690* 348 TGATCCCTGGATGTCTTGATCATCATGCAGGAGCCGGTCTTCCCGTTGCTTTCTTGGGGGAAAGC 416  
*PvPPa 6/1-867* 486 CGATCCAGTTGATGTTGTTGAGATTGGTGAAGAAGCAGAGGAAAATAGGCGAGGTTCTCAAAGTCAAACC 554  
 570 580 590 600 610 620  
*PvPPa 1/1-642* 369 TATAGGATTAATGCCCATGATTGACCAGGGTGAGAGGGATGACAAAGATCATAGCAGTTTGTGCTGATGAC 438  
*PvPPa 4/1-690* 417 AATTGGTCTCATGCCCATGATTGATCAGGGGGAGAAAGATGATAAAATAATCGCTGTATGTGCTGATGAT 486  
*PvPPa 6/1-867* 555 CTGGGGTGCATTGGCCCATGATTGATGAGGAGAAGCTTGAAGTGGAAAATAGTTGCAATCTCATTAGATGAT 624  
 640 650 660 670 680 690  
*PvPPa 1/1-642* 439 CCTGAGTTCCGTCATTA ... CACGGACATCAAGGAGCTTCTCCACATCGGCTAGCTGAAATCA 499  
*PvPPa 4/1-690* 487 CCTGAGTATCGTCATTA ... CAATGATATCAAGGAGCTTCTCCACATCGTTAGCTGAAATCC 547  
*PvPPa 6/1-867* 625 CCAAAGGCGTCATTGGTGAATGATGTCAATGACGTTGAGAAGCATTTTCCTGGAACCTCTACTGCAATCA 694  
 710 720 730 740 750 760  
*PvPPa 1/1-642* 500 GAAGATTCTTTGAGGAGTACAAGAAG ... AATGAAAA ... CAAAAAGGTTGACGTTGAGGACTTTCT 560  
*PvPPa 4/1-690* 548 GTCGCTTCTTTGAAGACTACAAGAAG ... AATGAAAA ... CAAGGAAGTTGCGGTAAACGACTTTT 608  
*PvPPa 6/1-867* 695 GGGACTGTTTCAGAGACTACAAGATACCTGATGGAAGCCTGCTAATAAATTGGGCTCGGCAACCAAGGC 764  
 780 790 800 810 820 830  
*PvPPa 1/1-642* 561 ACCAGCTGAAGC ... TGCCGTGGATGCCATCA ... AATACTCCATGACTTGTATGCTGCTTACATAGTTGA 626  
*PvPPa 4/1-690* 609 GCCTGCCACAGC ... TGCTTTGAAAGCTGTCA ... AGAGATCCATGAGCTTGTATGCGGACTACATAGTGA 674  
*PvPPa 6/1-867* 765 AGCTAATAAGGAATA TGCCTTAAGGTTATCAAGAGACCAACGAGTCTGGAACAAACTTATTAGAGA 834  
 850 860 870  
*PvPPa 1/1-642* 627 GAGCTTGAGGCACTAA ..... 642  
*PvPPa 4/1-690* 675 GAGCTTGAGGCGGTAG ..... 690  
*PvPPa 6/1-867* 835 TCAATTCTGCAGGAGAGTTGTCTCTTGGTAG ..... 867

**Figura 11. Comparación de secuencias de nucleótidos de tres pirofosfatasa de *Phaseolus vulgaris*. Los genes de frijol se nombraron de acuerdo a su identidad con las pirofosfatasas de *Arabidopsis thaliana*. *PVPPA1* y *PVPPA4* comparten 72.8%, *PVPPA1* y *PVPPA6* comparten 51.9% y *PVPPA4* y *PVPPA6* comparten 51.1% de identidad en su secuencia.**

Usando la información de las bases de EST y los experimentos de 3'RACE, no obtuvimos evidencia de la existencia de más de tres genes de pirofosfatasa. Sin embargo, con experimentos posteriores (apartado 7.5), donde se utilizaron técnicas de secuenciación masiva, se identificaron tres nuevos genes que codifican para pirofosfatasa.

### 7.3 Filogenia de las pirofosfatasa de *Phaseolus vulgaris*

Con las tres secuencias encontradas de las PPasas de frijol se elaboraron árboles filogenéticos para identificar su relación con las PPasas de otras plantas y de otros organismos. En la Figura 12 se muestra un árbol filogenético construido con el alineamiento de 98 secuencias de aminoácidos de las PPasas de diversos organismos. Con respecto a su secuencia primaria y a diferencia de lo que reportó Sivula y colaboradores (1999) las PPasas se pueden agrupar en cuatro subfamilias, la de procariotes (círculos rojos), la de los eucariotes (círculos cian) y para el caso de las plantas se observaron dos familias, una formada con las PPasas con una posible localización en el cloroplasto y la otra que agrupa a todas las PPasas con una aparente localización en el citosol (círculos verdes). Comparando las PPasas de frijol con las de otros organismos, existe solo un 36.93% de identidad entre PvPPa1 y la pirofosfatasa de *Escherichia coli* (EcPPasa), mientras que entre PvPPa1 y EcPPasa hay un 34.09%, y para PvPPa6 y EcPPasas existe solo un 25.00% de identidad. PvPPa1 y la pirofosfatasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ScPPasa) tienen un 23.95% de identidad, PvPPa4 y ScPPasa 25.75% y entre PvPPa6 y ScPPasa presentan una mayor identidad con un valor de 47.97%. En cuanto a la identidad que existe entre las PPasas de frijol con la PPasa de humano los porcentajes obtenidos son: para PvPPa1 y HsPPasa, 29.06%, PvPPa4 y HsPPasa 27.23% y PvPPa6 y HsPPasa es de 47.50% y al igual que ocurrió con la levadura, PvPPa6 tiene un mayor porcentaje de identidad con la subfamilia de las PPasas de eucariotes. De igual manera como lo reportó Sivula y colaboradores (1999), las otras PPasas de plantas representan un grupo separado y se encuentran más cerca de las PPasas de los procariotes y pueden abarcar rangos de identidad con respecto a las PPasas de frijol entre 36.36% (para PvPPa1 y SePPasa) y 40.08% (entre PvPPa1 y PhPPasa), mientras que en otras plantas pueden existir entre 35.37% (OsPPasa2 y GsPPasa) y 47.73% (PtPPasa5 y TlPPasa) de identidad.



Figura 12. Árbol filogenético de la familia de pirofosfatasas dependientes de  $Mg^{2+}$ . El árbol se construyó a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos. Las PPasas de las plantas se muestran marcadas con un círculo verde y las PPasas de frijol con un cuadro verde oscuro, las PPasas de las bacterias se distinguen con un círculo rojo, las PPasas de las algas con círculo amarillo y las de animales y hongos en color cian. Los nombres de los organismos y sus correspondientes PPasas se mencionan a continuación: ScPPasa1, *Saccharomyces cerevisiae*; ScPPasa2, *Saccharomyces cerevisiae* (mitocondrial); KIPPassa, *Kluyveromyces lactis*; PpPPasa *Pichia pastoris*; SpPPasa, *Schizosaccharomyces pombe*; DmPPasa, *Drosophila melanogaster*; CePPasa, *Caenorhabditis elegans*; BtPPasa, *Bos taurus*; HsPPasa, *Homo sapiens*; CrPPasa *Chlamydomonas reinhardtii*; CsPPasa, *Coccomyxa subellipsoidea*; CvPPasa, *Chlorella variabilis*; EcPPasa, *Escherichia coli*; CpPPasa, *Chlamydia pneumoniae*; CtPPasa, *Chlamydia trachomatis*; MpPPasa, *Mycoplasma pneumoniae*; MgPPasa, *Mycoplasma genitalium*; BsPPasa, *Bacillus sp*; GsPPasa, *Geobacillus stearothermophilus*; TaPPasa, *Thermoplasma acidophilum*; TIPPasa, *Thermococcus litoralis*; PhPPasa, *Pyrococcus horikoshii*; TtPPasa, *T. thermophilus*; MIPPassa, *Mycobacterium leprae*; SaPPasa, *Sulfolobus acidocaldarius*, AaPPasa, *Aquifex aeolicus*; HpPPasa, *Helicobacter pylori*; BbPPasa, *Bartonella bacilliformis*; RpPPasa, *Rickettsia prowazekii*; LpPPasa, *Legionella pneumophila*; RtPPasa *Rickettsia typhi*; CdPPasa, *Corynebacterium diphtheriae*; SmPPasa, *Staphylothermus marinus*; SePPasa, *Salmonella enterica*; YpPPasa, *Yersinia pestis*; BaPPasa, *Bifidobacterium adolescentis* HiPPasa, *Haemophilus influenzae*; VsPPasa, *Vibrio shilonii*; EsPPasa, *Erythrobacter sp*; AtPPa, *Arabidopsis thaliana*; PvPPa, *Phaseolus vulgaris*; PtPPa, *Populus trichocarpa*; PsPPa, *Picea sitchensis*; MtPPa, *Medicago truncatula*; OsPPa, *Oryza sativa*; ZmPPa, *Zea mays*; AhPPa, *Arachis hypogaea*; MdPPa, *Malus domestica*; StPPa, *Solanum tuberosum*; SmPPa, *Selaginella moellendorffii*; StPPa, *Solanum tuberosum*; RcPPa, *Ricinus communis*; GmPPa, *Glycine max*; CmPPa, *Cucumis melo*; BdPPa, *Brachypodium distachyon*; SbPPa, *Sorghum bicolor*; HvPPa, *Hordeum vulgare*; VvPPa, *Vitis vinifera*; LjPPa, *Lotus japonicus*; BrPPa, *Brassica rapa*; EgPPa, *Elaeis guineensis*; BvPPa, *Beta vulgaris*; TaPPa *Triticum aestivum*. Las plantas contiene varias isoformas de las PPasas y en el árbol filogenético se indican con un numero delante del nombre. Los números en las ramificaciones del árbol indican el porcentaje de la frecuencia en la que las proteínas se encuentran en dicha rama.

Para conocer la manera como se agrupan las PPasas de plantas se construyó un dendograma con 58 secuencias de PPasas de plantas. Del análisis de secuencias (Figura suplementaria 3) y con respecto a su estructura primaria las 58 PPasas de plantas analizadas tienen 28 residuos de aminoácidos conservados y tomando como referencia la PvPPa1 los residuos son: Arg 22, Pro 36, Trp 37, His 38, Asp 39, Glu 55, Ile56, Lys 63 Glu 65, Asn 88, Tyr 89, Thr 95 Gly 90, Asp 99, Asp 101, Pro 102, Asp 104, Gly, 116, Leu 119, Met 129, Ile130, Asp 131, Gly 133, Glu 134, Ile 139, Ala 141, Asp 145, Asp 146. Los residuos Trp 37, His 38, Asp 39 junto con la Pro 36 que sólo cambia en dos secuencias por Ser forman un motivo conservado en todas las PPasas de plantas. Además, los residuos Asp 99, Asp 101, Pro 102, Asp 104, forman el motivo rico en aspárticos esencial para la catálisis y junto con Glu 55, Lys 63, Glu 65, Tyr 89, Gly 90, Asp 131 y los aminoácidos Asp 139 y Lys 138 que están en 57 de las 58 secuencias, forman el conjunto de aminoácidos del sitio activo. Otros residuos que están conservados en las PPasas de plantas, no están representados en el análisis de Sivula y colaboradores (1999) y tampoco forman parte de los motivos ya mencionados son: Arg 22, Ile 56, Asn 88 Gly 116, Leu 119, Met 129, Ile 130, Gly133, Glu 134, Ile 139. Ala 141, Asp 145, Asp 146. El Asp 76 (42 en la PPasa de *E. coli*) está reportado por ser importante para la PPasa de la bacteria en la unión del sustrato (Avaeva *et al* 1996), pero su equivalente en levadura (D-71) no se ha visto tener la misma importancia.

En la Figura 13 se muestra el análisis filogenético de las PPasa de plantas elaborado a partir del alineamiento de la Figura Suplementaria 3. El árbol presenta cuatro ramificaciones principales y se observa la misma separación de las PPasas6 con respecto a las otras PPasas de plantas ya observado en el análisis elaborado con las PPasas de varios organismos (Figura 12). Las PPasas6 se encuentran más alejadas de las otras PPasas, se relacionan mejor entre ellas y se caracterizan por pertenecer al grupo de las PPasas de localización en el cloroplasto, mientras que las otras PPasas se sugiere que tienen una localización citosólica. PvPPa4 se encuentra compartiendo la misma ramificación con la AtPPa4 de *A. thaliana* y forman un grupo de 11 secuencias. PvPPa1 se relaciona con AtPPa1 y forman un grupo más amplio que incluye 25 secuencias de PPasas. Un cuarto grupo que se distingue en la filogenia contiene únicamente seis secuencias de PPasas y se caracteriza por ser más homogéneo ya que solo incluye plantas monocotiledóneas.



## 7.4 Análisis de la expresión de los RNA mensajeros de las pirofosfatasa bajo deficiencia de fósforo

Para realizar los experimentos de PCR cuantitativo se diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias de mRNAs pertenecientes a diferentes grupos funcionales (Tabla suplementaria 1), e incluían los genes de tres pirofosfatasa (*PVPPAI*, 4, 6); una pirofosfatasa de protones (*PVPPAIH<sup>+</sup>*); el factor transcripcional dependiente de calmodulina, *PVCAMTA*; un gen de tipo MYB, *PVPHRI*; el ortólogo de *AT4*, *PV4* (Valdés-López *et al.*, 2008); el factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$ , *PVEF1 $\alpha$* ; *PVACTINA*;; el gen de un posible transportador de alta afinidad para fosfato, *PVPT1* (Tian *et al.*, 2007); el transcrito *PVPS2* (que codifica para una probable fosfatasa; Hernández *et al.*, 2007) y el homólogo del gen *ATTIP41-like*, *PVTIP41-like*. La secuencia de *PVTIP41-like* se encontró al realizar un BLAST en la base de EST del *Gene Index Project* usando como referencia la secuencia de nucleótidos del gen *ATTIP41-like*. *PVACTINA*, *PVEF1 $\alpha$*  y *PVTIP41-like* se analizaron como posibles genes control, los dos primeros genes han sido usados ampliamente y *ATTIP41-like* fue encontrado por tener un nivel de expresión muy estable en plantas en condiciones de deficiencia de fósforo (Czechowski *et al.*, 2005).

El gen *PVPHRI* (homólogo de *ATPHRI*; Nilsson *et al.*, 2007) se utilizó en este estudio ya que actúa como un regulador positivo de la expresión de genes en el transporte, la movilización y la homeostasis del metabolismo del fósforo (Valdés-López *et al.*, 2008). *PVPT1* codifica para una proteína integral de membrana con un alta identidad a los transportadores de Pi de alta afinidad (Tian *et al.*, 2007). *PV4*, contiene un conjunto de pequeños marcos de lectura superpuestos entre sí y está involucrado en la toma y utilización del fosfato (Valdés-López *et al.*, 2008) y es ortólogo de *AT4* (Shin *et al.*, 2006). *PVPS2* codifica para una fosfatasa de proteínas y su secuencia de aminoácidos (deducida de la secuencia de bases) es similar a la de la proteína LePS2 de *Solanum lycopersicum* (tomate).

Se sabe que los transcritos para *PV4* y *PVPT1* incrementan considerablemente en condiciones de bajo fósforo. Los experimentos de PCR cuantitativo (qRT-PCR) revelaron incrementos en los niveles de estos dos transcritos confirmando la respuesta de la planta a la ausencia de fósforo. De cualquier modo, se revisó primero cada par de oligonucleótidos. Para ello, se realizaron PCRs y los productos se analizaron usando electroforesis en gel. Los datos de la Figura Suplementaria 4 confirman la presencia de una sola banda en todos los tejidos analizados. También, la especificidad de los



iniciadores se confirmó con las curvas de disociación y sólo aquellos pares de oligonucleótidos que formaron un pico único se usaron para el análisis de qPCR (Figura Suplementaria 5). Finalmente, la eficiencia de los oligonucleótidos se estimó de las curvas estándar generadas a partir de varias diluciones de cDNA (100ng a 0.01ng; Figura Suplementaria 6).

La selección del gen de referencia es un aspecto crítico y no trivial en la técnica de qRT-PCR. Se probaron tres candidatos para ser usados como genes de referencia. *PVACTINA*, *PVEF1 $\alpha$*  y el gen *PVTIP41-like*. De manera similar con un reporte previo (Czechowski *et al.*, 2005), se encontró a *PVTIP41-like* con niveles de expresión muy constantes en los tejidos probados en las plantas +P y -P (Figura Suplementaria 7) mientras que *PVACTINA* y *PVEF1 $\alpha$*  mostraron variaciones significativas en las plantas -P y no fueron usados como referencia. Por lo tanto, *PVTIP41-like* se usó como gen de referencia para la cuantificación de los niveles de transcritos en los experimentos de expresión reportados en este trabajo.

En la Figura 14 se muestran los gráficos de barras de la expresión relativa de los mensajeros para las tres PPasas. El transcrito *PVPPA1* (Figura 14A) presentó incrementos moderados en las hojas. Pequeños cambios se identificaron en los tallos y para el caso de las raíces se observó un incremento en R2 y una pequeña disminución en R1. El transcrito *PVPPA4* (Figura 14B) se encontró más abundante en las hojas H1 (viejas) y H5 (jóvenes) y presentó variaciones mínimas en los tallos y en R2; en la raíz R1 disminuyó por el estrés (Figura 14B). El transcrito de *PVPPA6* permaneció constante en todos los tejidos y solo en H5 se observó una ligera disminución.

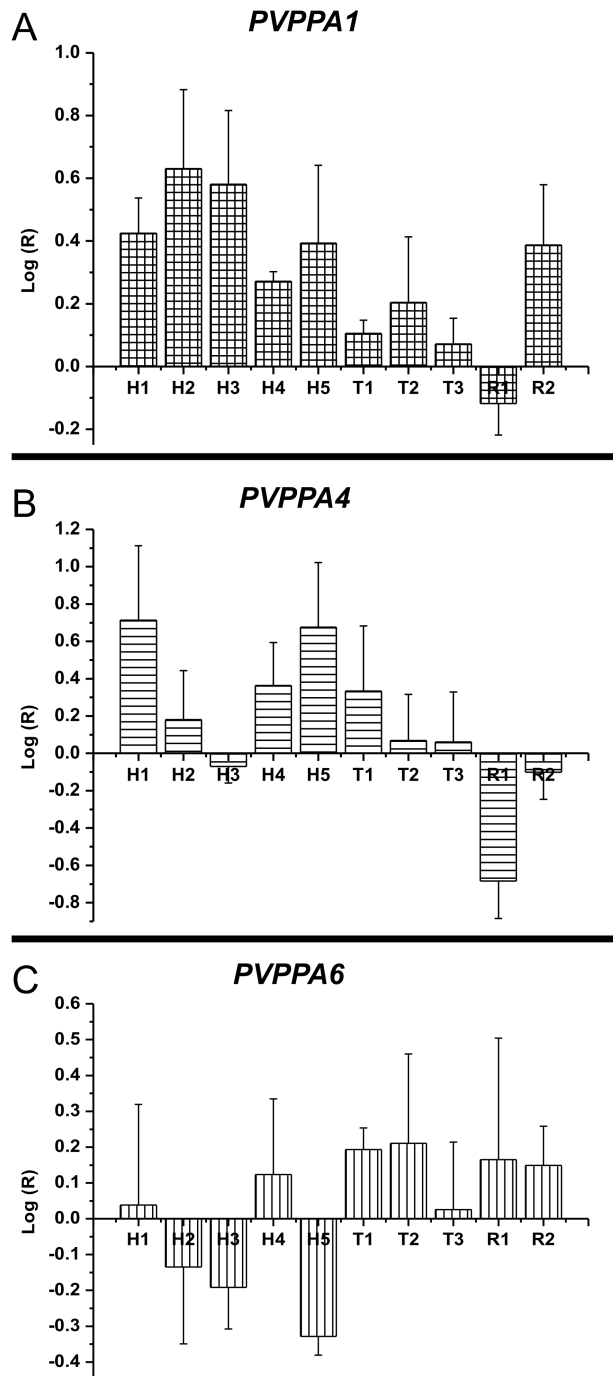
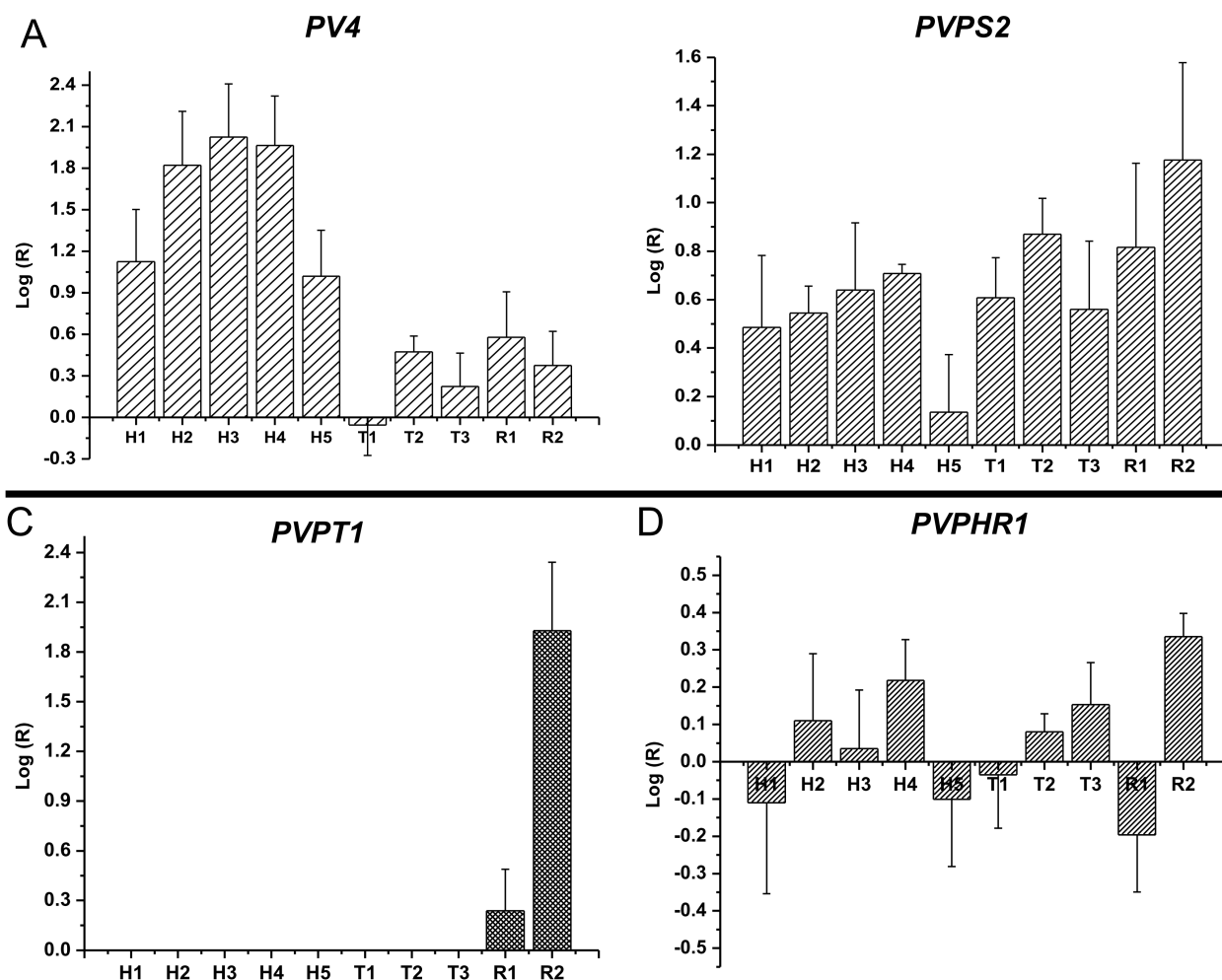


Figura 14. Efecto de la deficiencia de fósforo en la expresión de los mRNAs de tres pirofosfatasa inorgánicas de *P. vulgaris*. Los niveles de transcrito se midieron en plantas de frijol cultivadas en ausencia o en presencia de 1mM de fosfato por 3 semanas. El análisis de expresión se realizó usando la técnica de PCR cuantitativo en hojas (H), tallos (T) y raíces (R) y los tejidos se clasificaron como se muestra en la Figura 8. (A) Pirofosfatasa 1 (*PVPPA1*), (B) pirofosfatasa 4 (*PVPPA4*) y (C) pirofosfatasa 6 *PVPPA6*. Las pirofosfatasa fueron nombradas en base a la similitud de secuencia que existe con las pirofosfatasa de *A. thaliana*. El gen para *PVTIP41-like* se utilizó para normalizar los niveles de mRNAs y la expresión relativa (ver ecuación 2) se gráfica como logarítmica (Log R). Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $N=3$ ) de experimentos independientes.

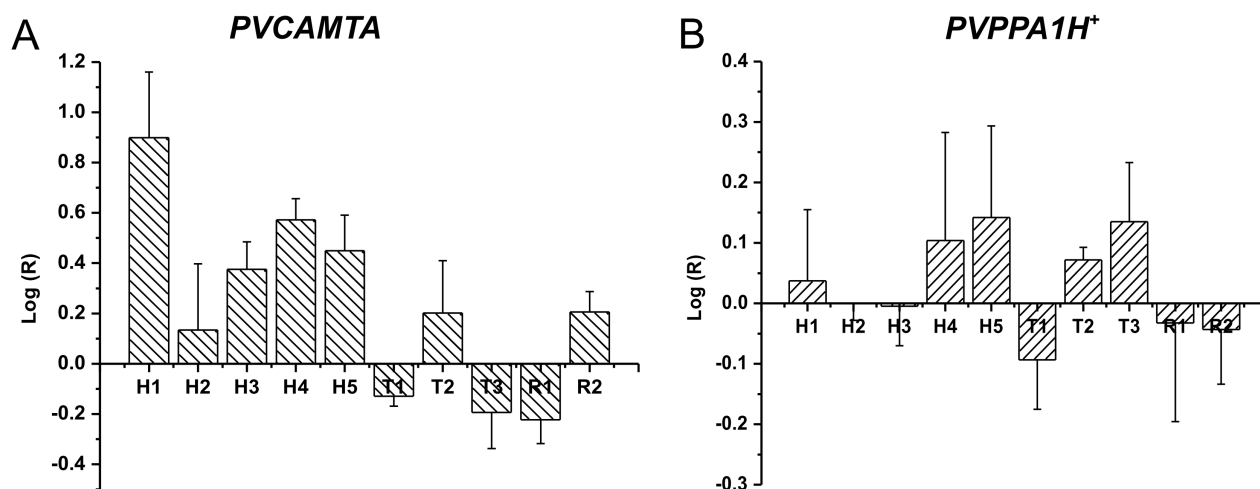
En la actualidad existe gran cantidad de información acerca de la respuesta de las plantas a las condiciones de bajo fósforo. Basándonos en esta información, analizamos la expresión de cuatro genes conocidos por estar involucrados en la respuesta a la deficiencia de fósforo (Figura 15) en los mismos tejidos utilizados para el análisis de las pirofosfatasas (ver Figura 8). Esto con el propósito de presentar un panorama más completo de cómo los tejidos estudiados difieren en la respuesta a las condiciones de estrés bajo estudio.

Los datos de la Figura 15 muestran los cambios en la expresión del mensaje para *PV4*, el RNA no codificante homólogo de *AT4* en *A. thaliana*. El tratamiento en condiciones de ausencia de fósforo provocó en las plantas (-P) una acumulación del transcrito de *PV4* en la mayoría de los tejidos probados, excepto en los tallos T1 y T3, mientras que en las hojas H2 H3 y H4 se observó el mayor aumento de la transcripción de *PV4* (Figura 15 A). *PVPS2* incrementó en todas las hojas excepto en H5, donde no se observó una respuesta a la deficiencia de fósforo. En los tallos *PVPS2* incrementó principalmente en T2, mientras en las raíces el mensaje de *PVPS2* registro el mayor cambio en R2 (Figura 15B). El gen para el transportador de fósforo uno (*PVPT1*) cambió ligeramente en las raíces R1, aumentó significativamente en las raíces R2 y no fue detectado en las hojas y tallos (Figura 15C y Figura Suplementaria 4). Finalmente, las condiciones de inanición de fósforo parecen no inducir cambios importantes en los niveles del mRNA para el factor transcripcional *PVPHR1* y sólo se observó un ligero incremento en R2 (Figura 15D).



**Figura 15. Análisis de expresión de cuatro genes usados como monitores de la respuesta a la deficiencia de fósforo en las plantas de *P. vulgaris*.** Los niveles de los transcritos se midieron en plantas cultivadas en ausencia o presencia de 1mM de fosfato por 3 semanas. El análisis se realizó con la técnica de RT-PCR cuantitativo en hojas (H), tallos (T) y raíces (R) clasificadas como se indica en la Figura 8. (A) *Pv4*, (B) *PvPS2*, (C) *PvPT1* y (D) *PvPHR1*. El gen *PvTIP41-like* se utilizó para normalizar los niveles de mRNAs y la expresión relativa se gráfica como logarítmica (Log R). Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $N=3$ ) de experimentos independientes.

Finalmente, se analizó la expresión de la pirofosfatasa de la vacuola *PVPPAIH<sup>+</sup>* y el activador de la transcripción dependiente de calmodulina *PVCAMTA*. Para el transcrito de *PVCAMTA* los niveles de mensaje se incrementaron significativamente en las hojas H1 y H4 debido al estrés, mientras en los tallos y las raíces se observaron cambios mínimos (Figura 16A). Como resultado de la deficiencia de fósforo, el transcrito que codifica para la pirofosfatasa de protones de la vacuola (*PVPPAIH<sup>+</sup>*) registró cambios mínimos en todos los tejidos analizados (Figura 16B).



**Figura 16. Análisis de expresión de los mRNAs de la pirofosfatasa vacuolar y del activador de la transcripción dependiente de calmodulina de *P. vulgaris*.** Los niveles de los transcritos se midieron en plantas cultivadas en ausencia o presencia de 1mM de fosfato por 3 semanas. El análisis se realizó con la técnica de RT-PCR cuantitativo en hojas (H), tallos (T) y raíces (R) clasificadas como se indica en la Figura 8. (A) Activador de la transcripción dependiente de calmodulina (*PVCAMTA*) y (B) Pirofosfatasa vacuolar (*PVPPA1H<sup>+</sup>*). El gen *PVTIP41-like* se utilizó para normalizar los niveles de mRNAs y la expresión relativa se gráfica como logarítmica (Log R). Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $N=3$ ) de experimentos independientes.

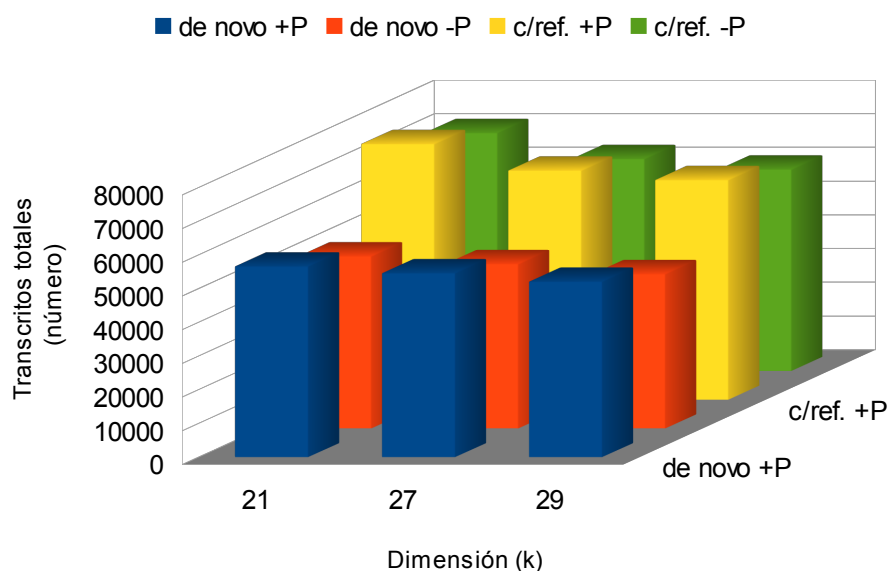
Con el propósito de identificar los cambios estadísticamente significativos del análisis de expresión por qRT-PCR y debido a que los datos no se ajustan a una distribución normal (Figura Suplementaria 8) se utilizó el método no paramétrico de U de Mann-Whitney. En la Tabla 3 se muestra el resumen de los cambios estadísticamente significativos debidos a la deficiencia de fósforo para cada mensajero y en cada uno de los tejidos analizados. Sin embargo esta prueba con muestras de tamaño pequeño tiende a cometer errores de tipo II y no encontrar diferencias cuando existe en la realidad.

**Tabla 3. Cambios estadísticamente significativos entre los tratamientos +P y -P de los genes analizados por qRT-PCR. La probabilidad se estimó usando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. \* y \*\* corresponden a las diferencias estadísticamente significativas con una probabilidad de  $p<0.05$  y  $p<0.01$  respectivamente.**

Transcrito / Tejido	H1	H2	H3	H4	H5	T1	T2	T3	R1	R2
<i>PVPPA1</i>									*	
<i>PVPPP4</i>						*			**	
<i>PVPPP6</i>						*		**	*	**
<i>PV4</i>	**	**	**	**	**	*	*			
<i>PVPS2</i>						*	**			**
<i>PVPHR1</i>	*			**			*			
<i>PVPT1</i>										*
<i>PVCAMATA</i>	**			*		**		**		
<i>PVPPAH<sup>+</sup></i>				*			*			

## 7.5 Estudio de la transcripción en las hojas H3 y H5 de *P. vulgaris* mediante secuenciación masiva.

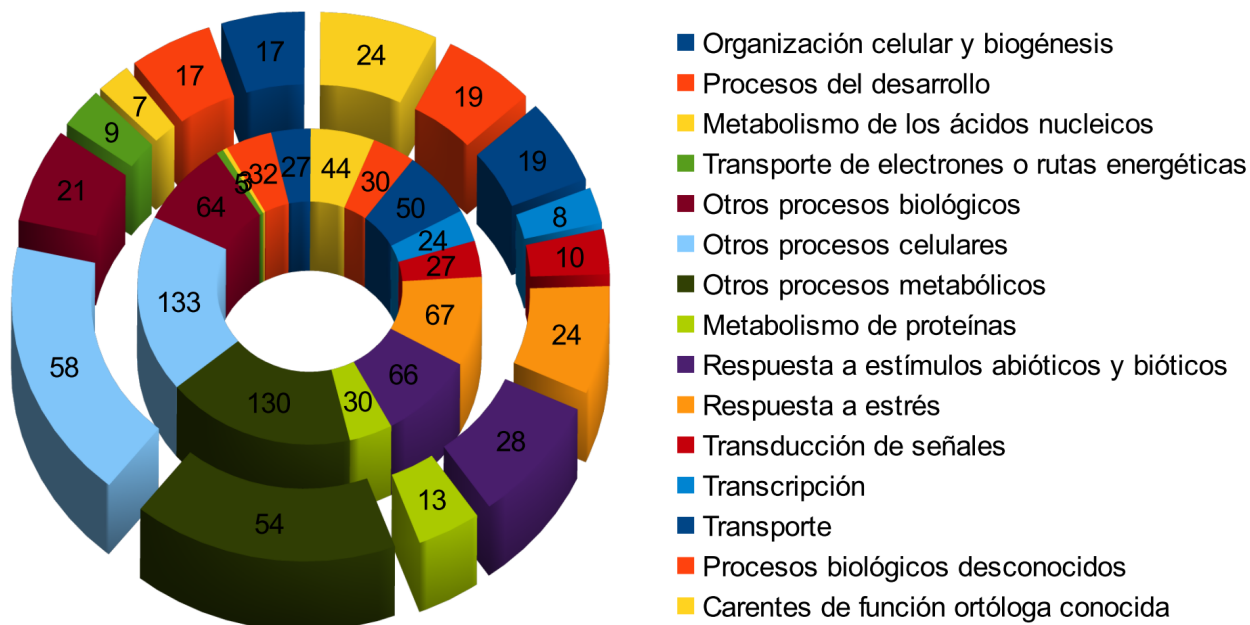
Debido a que las hojas H3 en condiciones de deficiencia de fósforo contenían los niveles más bajos de este elemento y las hojas H5 presentaba los cambios fenotípicos más significativos (coloración, contenido de pigmentos fotosintéticos y % de humedad), resultó de interés conocer con más detalle la respuesta al estrés de fósforo en la transcripción en estas hojas. Para obtener la información se realizó un análisis de la expresión de los mensajeros mediante secuenciación masiva de RNA (RNAseq) en la plataforma Illumina/Solexa de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA (UUSMD). El ensamblado de los transcritos se realizó empleando los programas VELVET y OASES. En estos programas, el resultado puede variar significativamente dependiendo de la longitud (k) del gráfico (secuencia) de *de Bruijn* que se elija, por ello, es necesario repetir el ensamblado con diferentes longitudes del gráfico y combinar los datos en un ensamblado global, lo que garantiza obtener el mejor resultado posible. El efecto de variar la dimensión del gráfico (k) se muestra en la Figura 17. En esta figura también se comparó el valor de tener un genoma de referencia, ya que el número total de transcritos identificados es significativamente mayor cuando el ensamblado se realizó contra la referencia, que cuando se hace *de novo*.



**Figura 17. Efecto de la longitud del gráfico (valor de la dimensión; k) sobre el ensamblado de las lecturas.**

Con los resultados de este experimento, se realizó una comparación de los genes cuya expresión se redujo (genes subexpresados) y de los genes que elevaron su expresión (genes sobreexpresados) en condiciones de deficiencia de fósforo para las hojas H5 y H3. Para estimar la expresión se empleó el número de lecturas mapeadas sobre cada transcrito, normalizadas según el parámetro RPKM (total de lecturas leídas entre kilobases del exon por millones de lecturas mapeadas). La deficiencia de fósforo indujo en la hoja H5 la subexpresión de 732 genes y la sobreexpresión de sólo 328, mientras que en la hoja H3 se subexpresaron 391 y se sobreexpresaron 299. En las Figuras 18 y 19 se muestran ordenados por función, resultado de la búsqueda de palabras clave en las anotaciones de transcritos, los transcritos que se sobreexpresaron (gráfico circular externo) y subexpresaron (gráfico circular interno) en las hojas H5 y H3 respectivamente. La mayoría de los mensajes contabilizados que se subexpresaron y sobreexpresaron en ambas hojas, están incluidos en las categorías de otros procesos biológicos celulares y metabólicos, aunque hay también un número importante de mensajes que responden al estrés y a los estímulos abióticos y bióticos. Los transcritos cuya función no ha sido anotada en el genoma de *A. thaliana*, los involucrados en el transporte, el desarrollo y junto con los mensajeros carentes de un ortólogo de referencia tienen una representación menor y con mucho menos representantes que se sobreexpresaron o subexpresaron en las dos hojas analizadas, se encuentran los grupos del metabolismo de los ácidos nucleicos, proteínas, transporte de electrones, organización celular y procesos del desarrollo. Una lista de los 90 genes que cambiaron más (con un cambio de más 3.5 veces) para cada una de las hojas (H5 y H3) por la deficiencia de fósforo se muestran en las Tablas Suplementarias 3 4, 5 y 6. Entre los genes sobreexpresados en H5 se encontraron un número importante relacionados con el metabolismo de los lípidos, varios genes con función desconocida y genes que codifican para proteínas de la superfamilia de las histonas. Por otro lado, entre los genes subexpresados se encontraron un gran número de genes con función desconocida, genes que codifican para la familia de las enzimas alcohol deshidrogenasas y del transporte del cobre por mencionar algunos.

## H5

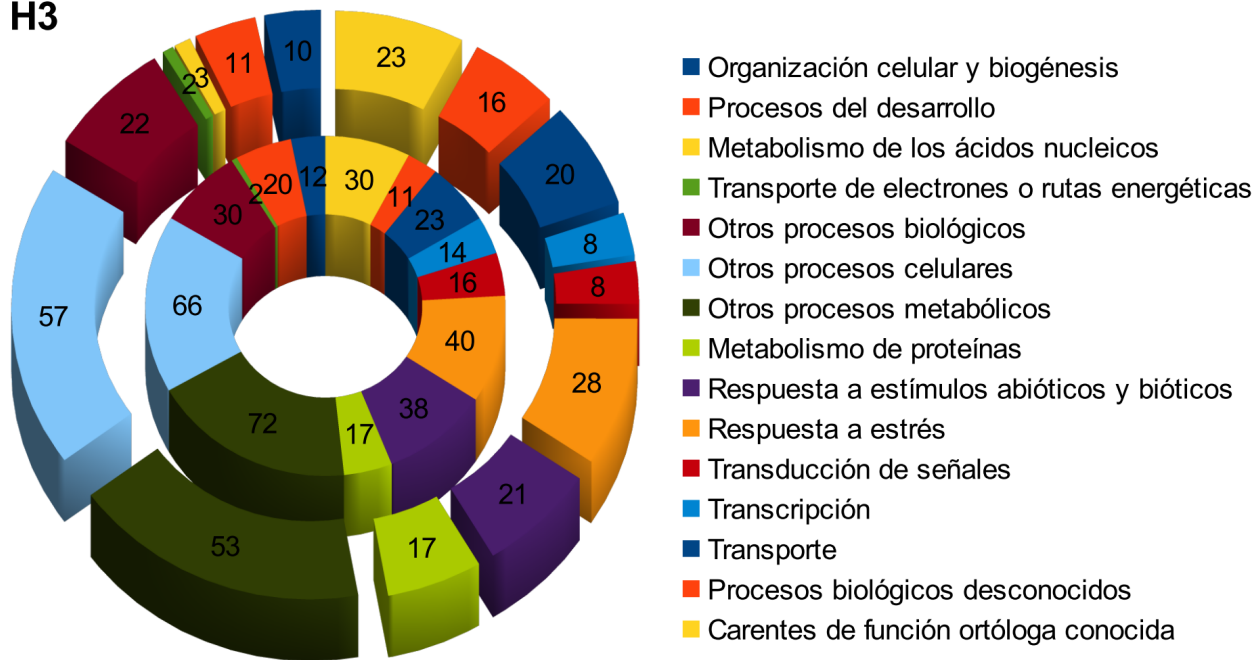


**Figura 18. Contabilidad de los transcritos que se sobreexpresan y subexpresan en la hoja H5 bajo deficiencia de fósforo. La contabilidad se realizó mediante la búsqueda de palabras clave en las anotaciones de los transcritos. Las categorías son mutuamente excluyentes. En el círculo interior se encuentran los genes que se subexpresaron y en el círculo exterior los genes que se sobreexpresaron.**

De los resultados del transcriptoma para la hoja H3 se observó que muchos de los genes que más se sobreexpresaron están involucrados en el metabolismo del fósforo y en función no conocidas. Mientras que para los mensajeros que más se subexpresaron, muchos se encontraron por codificar para proteínas de resistencia a patógenos. Además, los datos de RNA-seq nos permitieron identificar tres nuevas secuencias que codifican para pirfosfatasa.



H3



**Figura 19. Contabilidad de los transcritos sobreexpresados y subexpresados en la hoja H3 bajo deficiencia de fósforo. La contabilidad se realizó mediante la búsqueda de palabras clave en las anotaciones de los transcritos. Las categorías son mutuamente excluyentes. En el círculo interior se encuentran los genes que se subexpresaron y en el círculo exterior los genes que se sobreexpresaron.**

Finalmente del análisis masivo para las hojas H3 y H5 se obtuvo información del cambio en la expresión de los transcritos debido a la deficiencia de fósforo de los mensajeros de las 3 PPasas y para los mensajeros *PV4*, *PVPS2*, *PVPT1*, *PVPR1*, *PV CAMTA* y *PVPPAH<sup>+</sup>* estudiados por RT-PCR tiempo real. Los resultados de la Tabla 4 indican para el caso de la hoja H5 que no existen cambios para ninguno de los mensajeros analizados debido al estrés por fósforo. Sin embargo, para las hojas H3 se registro un cambio en el transcrito *parecida\_PVPPA4*, en un gen que codifica para una PPasas no identificada previamente por los experimentos 3'RACE y que aparece anotada como *PVPPa4* y en los genes marcadores de la deficiencia de fósforo *PVPS2* y *PV4*. Además del gen parecido a *PVPPA4* otros dos genes que codifican para PPasas fueron identificadas durante el ensamblaje del transcriptoma; *PVPPA3* ortólogo del gen *ATPPA3* de *A. thaliana* y que sólo se expresa en tejidos florales y un gen parecido a *PvPPa1* (*parecida\_PVPPa1*), por lo que al final con la información de la búsqueda en la bases de datos, los experimentos 3'RACE y el análisis del transcriptoma se pudieron identificar seis pirofosfatasa clásicas (Figura Suplementaria 10).

**Tabla 4 Análisis transcriptómico de las hojas H3 y H5 para los genes estudiados por RT-PCR tiempo real en condiciones de deficiencia de fósforo. El valor de cero indica que no hay cambios en los niveles del gen debido a la deficiencia de fósforo y el número uno indica cambios en los niveles del transcrito debido a la deficiencia de fósforo**

Nombre	Código de identificación	% de identidad	Lg2Δ(H5 <sub>-p</sub> /H5 <sub>+p</sub> )		Lg2Δ(H3 <sub>-p</sub> /H3 <sub>+p</sub> )	
<i>PVPPA1</i>	Phwlv091008292m	99.84	-0.425	0	0.432	0
<i>Parecida_PVPPA1</i>	Phwlv091004174m	78.41	0.258	0	-0.331	0
<i>PVPPA3<sup>a</sup></i>	Phwlv091007560m	100	—		—	
<i>PVPPA4</i>	Phwlv091024033m	99.86	0.669	0	0.220	0
<i>Parecida_PVPPA4</i>	Phwlv091017440m	87.48	-1.195	0	2.313	1
<i>PVPPA6</i>	Phwlv091014870m	99.65	-0.309	0	0.330	0
<i>PvPPAH<sup>+</sup></i>	Phwlv091029456m	98.08	-0.297	0	0.152	0
<i>PVPS2</i>	Phwlv091029029m	99.63	-0.121	0	4.531	1
<i>PvPT1<sup>b</sup></i>	Phwlv091021400m	99.56	-0.025	0	-0.450	0
<i>PvPHR1</i>	Phwlv091019666m	99.8	-0.220	0	1.039	0
<i>PvCAMTA</i>	Phwlv091004733m	98.08	-0.176	0	-0.282	0
<i>Pv4<sup>c</sup></i>	—	100	0.006	0	2.139	1

<sup>a</sup> El gen de la pirofosfatasa 3 de *A. thaliana ATPPA3* ortólogo de *PVPPA3* se expresa solo en tejidos florales

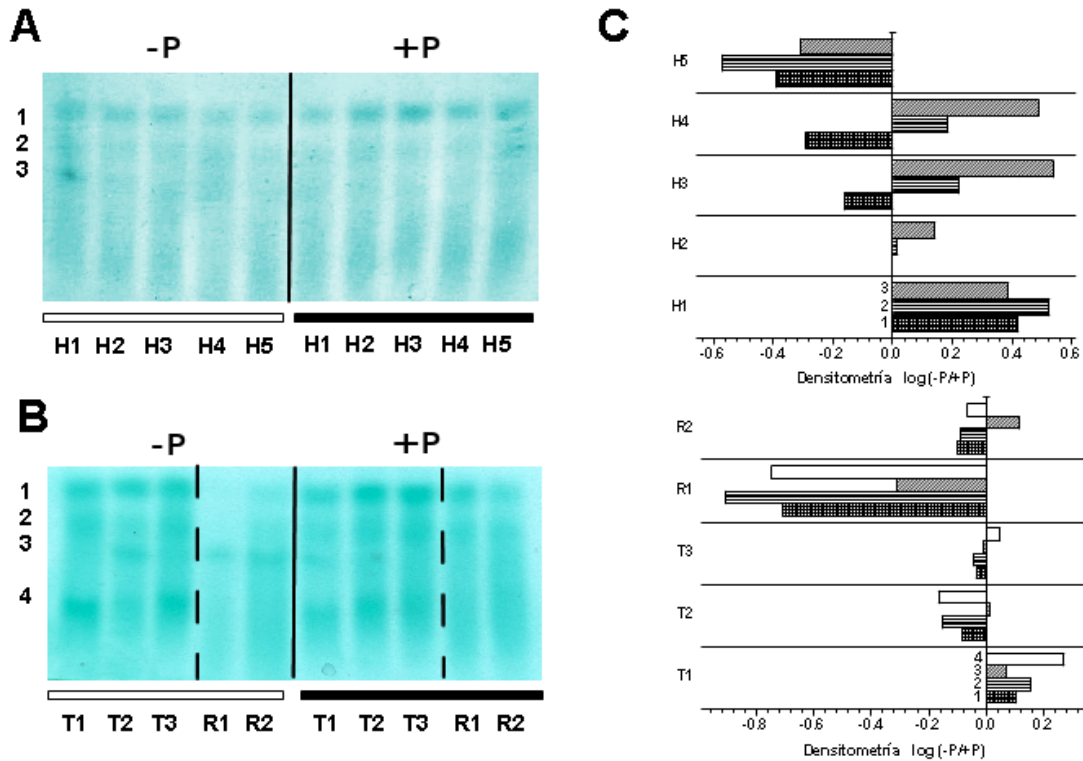
<sup>b</sup> El gen de *PVPT1* se expresa solo en raíces

<sup>c</sup> *PV4* no tiene un código de identificación en las bases de datos del genoma de frijol

## 7.6 Determinación de la actividad de las pirofosfatasa en diferentes órganos de las plantas de *Phaseolus vulgaris*

Para completar la información del efecto que tiene la deficiencia de fósforo sobre las enzimas PPasas y poder relacionar la información de los mensajeros (obtenida por las técnicas de RT-PCR tiempo real y de secuenciación masiva), se midió la actividad total de las PPasas en los diferentes tejidos de las plantas en condiciones -P y +P. El análisis de varianza indicó diferencia estadísticamente significativas para la actividad total PPasas debido a la deficiencia de fósforo (Figura Suplementaria 9). Sin embargo, con este ensayo no es posible identificar cambios de actividad de las distintas PPasas, por ello se utilizó electroforesis nativa. Este análisis se realizó usando los diferentes órganos de las plantas crecidas en condiciones control (+P) y en deficiencia de fósforo (-P). Las hojas, tallos y raíces se separaron en los mismos grupos considerados en el análisis del qRT-PCR (ver Figura 8). Se analizó la densidad del color relativo de las bandas de actividad y los análisis densitométricos se muestran en la Figura 20C. En las hojas, las bandas más inferiores eran difusas por lo que no se consideraron en el análisis (Figura 20A y 20C). Los zimogramas revelaron cambios en la intensidad relativa de las bandas por la ausencia de fósforo y se observó una disminución generalizada de la actividad pirofosfatasa en

las hojas más jóvenes (H5) y en la raíz primaria (R1). Las hojas H1 mostraron incrementos moderados de manera general y se encontró una respuesta intermedia en el resto de los tejidos estudiados (Figura 20C).



**Figura 20. Efecto de la deficiencia de fósforo en la actividad pirofosfatasa de diferentes tejidos de *P. vulgaris*.** Los zimogramas fueron usados para la detección de la actividad en extractos crudos de hojas (A), tallos y raíces (B) en plantas control (barra negra) y en condiciones de ausencia de fósforo. Los diferentes tejidos: hojas (H), tallos (T) y raíces (R) fueron separados como se describe en la Figura 8. Los geles nativos se cargaron con 5  $\mu\text{g}$  de proteína por carril para las hojas (A) y 10  $\mu\text{g}$  para los tallos y las raíces (B). Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron incubados con una solución de pirofosfato y magnesio por 30 min y revelados con verde de malaquita para identificar el fosfato liberado. Las bandas de los geles se numeran de menor a mayor movilidad electroforética. (C) Análisis densitométrico de los zimogramas. La relación densitométrica entre el control (+P) y el tratamiento (-P) se expresó como  $\log(-P/+P)$ . Un valor negativo corresponde a una disminución de la actividad, valores positivos indican mayor actividad pirofosfatasa y cero indica la ausencia de cambio en las muestras -P. En ausencia de  $\text{MgCl}_2$ , los geles sólo mostraban una tinción de fondo uniforme (no se muestra). Los números a la izquierda de cada barra en S1 y L1 corresponden al número de banda que se indica a la izquierda de los geles en (A) y (B). La carga de proteína en los geles se confirmó en un gel paralelo con SDS-PAGE, que se tiñó con plata (no se muestra).

## 8 Discusión

La información científica recopilada sobre las pirofosfatasa en los últimos 20 años da evidencia de su importancia en el metabolismo central de los organismos (Lundin *et al.*, 1991; Lerchl *et al.*, 1995; de Graaf *et al.*, 2006). Sin embargo, más allá de la función de hidrolizar el PPI, existen muchas interrogantes sobre su expresión y regulación en el desarrollo normal, y más aún en condiciones de estrés. Para estudiar el efecto del estrés abiótico y, en particular, la respuesta a las limitaciones de fósforo en la expresión y la actividad de las PPasas, usamos *P. vulgaris* (el frijol común) como planta modelo porque es una fuente importante de alimento, comprende 50% de todas las leguminosas consumidas (Broughton *et al.*, 2003) y frecuentemente se cultiva en suelos pobres en fosfatos. Desafortunadamente, su genoma no estaba completamente secuenciado cuando se realizó este trabajo y el genoma liberado hace apenas algunos meses tiene una anotación incompleta. En este trabajo se hizo uso de la información presente en las bases de datos de ESTs. Mediante la técnica de 3'RACE se pudieron identificar tres isoformas de pirofosfatasa (*PVPPA2*, *PVPPA4* y *PVPPA6*), que nombramos de acuerdo a su identidad con las pirofosfatasa de *Arabidopsis*. Además, los experimentos 3'RACE nos permitieron identificar otras secuencias y diseñar una pequeña base de datos que se publicó y está disponible en el NCBI (los números de acceso se muestran en la Tabla 2).

Con las secuencias de aminoácidos de las tres PPasas identificadas y con la de otras PPasas se elaboraron dos árboles filogenéticos. En el primer dendograma se hizo una clasificación de las PPasas de frijol con las de otros organismos (Figura 12). En este árbol las PPasas de plantas se agrupan en dos ramas distantes, pero la distribución de sus miembros está más acotada, lo que indica que son más parecidas entre ellas, a diferencia de lo que ocurre para las otras dos ramas que incluyen a los procariotes, los hongos y los mamíferos y que sus miembros son más diversos entre ellos. El hecho de que las PPasas de bacterias estén menos relacionadas indica una menor identidad en sus secuencias y una mayor divergencia, característica que puede ser aprovechada para identificar enzimas con propiedades particulares y extrapolarlas a las PPasas de plantas. Otra observación interesante en las PPasas del grupo seis de plantas con una aparente localización al cloroplasto, es que se encuentran mejor relacionadas a las PPasas de los hongos y mamíferos, mientras que el resto de las PPasas de plantas se encuentran más relacionadas con las PPasas de los procariotes.

En el segundo árbol sólo se analizaron las PPasas de plantas (Figura 13) y el análisis de secuencia identificó varios aminoácidos que están conservados y que pueden ser esenciales para la catálisis, regulación y/o para la estructura tridimensional de la enzima. Además del bien identificado motivo rico en aspárticos DXDPXD importante para la unión de los magnesios y la catálisis, los motivos PWHD, MIDXGE y la triada DYK están conservados en todas las secuencias de PPasas de plantas analizadas y su investigación por técnicas moleculares sería muy interesante. En el árbol filogenético de las PPasas de plantas se distingue la misma división observada en la Figura 12, donde las secuencias de las PPasas seis se separan y sugiere funciones propias para este grupo de enzimas. Las ramas donde se agrupan las otras PPasas se distinguen por tener una anotación irregular encontrando por ejemplo PPasas1 con PPasas4 y PPasas3, ello puede ser resultado de la alta identidad en las secuencias o por una mala anotación. Un análisis más profundo con métodos computacionales o mediante estrategias experimentales podría ayudar a resolver este problema. De cualquier modo y a pesar de la heterogeneidad de los grupos en donde se encuentran, las PPasas de *P. vulgaris* estas tienen una relación más estrecha con las PPasas de otras leguminosas (*G. max* y *M. truncatula*).

Las pirofosfatasas forman parte del metabolismo del fósforo y la información más reciente sobre la respuesta de las plantas a las condiciones de bajo fósforo (Yang y Finnegan, 2010; Chiou y Lin, 2011) sugiere que la expresión de los genes y/o la actividad enzimática de estas proteínas puede cambiar en las plantas bajo condiciones de estrés. Sin embargo, en muchos estudios publicados hasta la fecha, la respuesta a la deficiencia de fósforo ha sido medida en la planta completa, en las raíces o en la parte aérea como un todo. No obstante, las respuestas al estrés parecen ser dependientes del órgano estudiado y de la posición de cada órgano en la planta (Chiou y Lin, 2011). Además, debido al proceso de crecimiento, la posición de cada órgano está relacionado con la edad y el estado del desarrollo (Yang y Finnegan, 2010; Chiou y Lin, 2011) Por ello, la disponibilidad de fósforo a nivel local puede variar con la posición del tejido en la planta. En este trabajo la respuesta de plantas en condiciones +P y -P se midió en tres diferentes tejidos clasificados de acuerdo a su posición en la planta (Figura 8). Como era esperado, la deficiencia de fósforo provocó una reducción del contenido de fósforo en todos los tejidos analizados, pero curiosamente no de la misma manera en todos ellos, por lo que debe existir una regulación fina del proceso de movilización del fósforo entre las hojas y cuando la planta está en condiciones de estrés. Lo anterior resulta en una mayor disminución del fósforo en las hojas

intermedias H3 (Figura 10). Sin embargo, en tallos y raíces de las plantas en deficiencia, el contenido de fósforo no parece depender de la posición del tejido. De cualquier modo, como ya se mencionó, en las raíces el contenido de fósforo y su movilización también dependen del tipo de raíz (Wanke, 1998; Rubio *et al.*, 2004).

Se reconoce que la deficiencia de fósforo provoca cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas (Rouached *et al.*, 2010) lo que refleja la situación de estrés de los tejidos. Uno de ellos es el cambio de color de las hojas (Jiang *et al.*, 2007). En este trabajo se detectaron cambios en los contenidos de clorofila y carotenos (Tabla 1) en las hojas más jóvenes (H3, H4 y H5). El hecho de que exista un aumento en el contenido de clorofila es interesante ya que se sabe que la deficiencia de fósforo puede no implicar cambios en la fotosíntesis (Kondracka y Rychter, 1997). Seguramente, el estudio de los complejos fotosintéticos aportaría información sobre los cambios en la fotosíntesis bajo estrés de fósforo, en los distintos tipos de hojas. Además, en las mediciones espectrofotométricas, se observó una disminución en el contenido de agua en las hojas más jóvenes (H4 y H5) pero no en las raíces, indicando que las plantas fueron regadas de manera similar y los efectos observados aquí se debieron a la respuesta de la planta a la ausencia de fósforo.

Con ayuda de la técnica qRT-PCR se analizó la expresión de cuatro genes (*PVPT1*, *PV4*, *PVPHR1* y *PVPS2*) implicados en la respuesta de la planta a condiciones de bajo fósforo. Tian y colaboradores (2007) reportaron que *PVPT1* codifica para un transportador de fósforo de alta afinidad, observando un incremento en el nivel de este transcrito en condiciones de bajo fosfato. En *S. lycopersicum* (tomate) el homólogo de PvPT1 (LePT1) se acumula en los pelos de las raíces de plantas, en condiciones de estrés por fósforo (Daram *et al.*, 1998). En este trabajo, se observó un incremento significativo del mRNA para PvPT1 en las raíces laterales R2 (Figura 15C). *PV4* tiene funciones relevantes en la regulación de la translocación del fosfato de las raíces hacia las hojas (Valdés-López y Hernández, 2008). Nosotros también encontramos un incremento significativo de este transcrito en las hojas principalmente en H3 y H4 después de exponer las plantas durante 3 semanas a condiciones de ausencia de fósforo, en contraste a lo reportado por Valdés-López y Hernández (2008), pero de manera semejante a los experimentos de expresión con plantas transgénicas de *A. thaliana*, en los cuales la expresión con GUS bajo el control del promotor de *AT4* se observó en el tejido vascular de las hojas, pero sólo después de dos semanas de someter a las plantas a deficiencia de fósforo (Shin *et al.*, 2006).

Por lo tanto, el período usado para inducir el estrés en este trabajo puede explicar la aparente discrepancia con el primer reporte sobre *PV4*. Está demostrado que PvPHR1 es un regulador positivo de genes implicados en el transporte, removilización y homeostasis del fosfato (Valdés-López *et al.*, 2008). Esta proteína actúa como factor transcripcional en condiciones de bajo fósforo (Hernández *et al.*, 2009) y puede ser importante al comienzo de la respuesta a la deficiencia de fósforo. En el presente trabajo se observó un pequeño incremento del mensajero para *PVPHR1* en la raíz R2 y en concordancia con lo reportado por Valdés-López y colaboradores (2008).

Se ha observado que *PVPS2* se induce fuertemente por bajos niveles de fósforo (Tian *et al.*, 2007). Inicialmente identificado como una fosfatasa, el homólogo de PvPS2 en *A. thaliana* (llamado AtPPsPase1), recientemente se observó que tiene actividad de pirofosfatasa (May *et al.*, 2011). La actividad de pirofosfatasa de esta proteína es activada por  $Mg^{2+}$  y su máxima activación se reportó con 12 mM de  $Mg^{2+}$ , pero el catión no es esencial para la actividad. Esta enzima presentó una actividad baja contra otros sustratos y su  $K_M$  para PPi fue 38.8  $\mu M$ . En contraste a las pirofosfatasas clásicas de plantas que actúan como monómeros (Gómez-García *et al.*, 2006; Navarro de la Sancha *et al.*, 2007) la proteína AtPPsPase1 es activa como tetrámero. PvPS2 comparte 61.4% de identidad en su secuencia de aminoácidos con AtPPsPase1, pero su actividad no ha sido estudiada y en cualquier caso, las funciones que desempeñan estas proteínas en la respuesta al estrés por la deficiencia de fósforo no están claras. De cualquier modo, los cambios en la expresión del mensajero para *PVPS2* reportados previamente (Tian *et al.*, 2007) y los observados en este trabajo sugieren una función importante de esta proteína en la adaptación a la deficiencia de fósforo.

El metabolismo del PPi tiene una función central en las plantas (Kornberg, 1957) y su concentración permanece constante en el citoplasma (Weiner *et al.*, 1987), e igualmente bajo condiciones de estrés (Duff, Moorhead, Lefebvre, & Plaxton, 1989b). Para explicar estos hechos la velocidad de hidrólisis del PPi puede cambiar para compensar la velocidad de producción de PPi. En el presente trabajo, nosotros reportamos los cambios en la expresión relativa de los mensajeros que codifican para tres pirofosfatasas en varios órganos de plantas de *Phaseolus vulgaris* cuando fueron sometidas a condiciones de ausencia de fósforo. El análisis de la secuencia en aminoácidos predice para la pirofosfatasa PvPPa6 un péptido de tránsito hacia el cloroplasto y comparte un 73.6 % de identidad con la pirofosfatasa del cloroplasto de *A. thaliana* (Schulze *et al.*, 2004). En las células de las plantas

se demostró que la actividad era alta en el cloroplasto (Weiner *et al.*, 1987) y que es esencial para la supervivencia de la planta (George *et al.*, 2010). Debido a este resultado, no es sorprendente que en condiciones de ausencia de fósforo el transcrito para *PVPPA6* permanezca constante en muchos de los tejidos analizados, con excepción de la hoja H5 (mas jóvenes) donde se observó una ligera disminución. En contraste, no se encontraron péptidos de localización subcelular para las secuencias de *PVPPA1* y *PVPPA4*, sus secuencias en aminoácidos comparten 79.0 % de identidad y su mayor divergencia la podemos encontrar en las regiones N-terminal. Sin embargo, a pesar de compartir una alta identidad, tienen una expresión diferencial que es muy evidente en los tejidos H3 y R2 (Figura 14A y Figura 14B). De manera interesante, la expresión en las hojas para el mensajero de la pirofosfatasa *PVPPA4* (Figura 14B) presenta una tendencia opuesta a la variación del contenido de fósforo en las hojas (Figura 10); sin embargo, la información obtenida es insuficiente para proponer un papel fisiológico, pero la identificación y el análisis de las regiones promotoras de estas pirofosfatasa podrían ayudar a dilucidar cómo es que se controla su transcripción y esto a su vez podría correlacionar indirectamente con la abundancia de la proteína.

Aparte de las pirofosfatasas solubles, existe otra clase de pirofosfatasas en el genoma de las plantas, se conocen como pirofosfatasas de protones de la membrana vacuolar. Estas pirofosfatasas difieren de las solubles en secuencia, estructura 3D y funciones. El genoma de *A. thaliana* codifica una pirofosfatasa vacuolar (AtAVP1) y se ha demostrado que está involucrada en varias respuestas al estrés (Gaxiola, *et al.*, 2011), incluyendo condiciones de deficiencia de fósforo (Yang *et al.*, 2007). Nosotros no observamos cambios en la abundancia del transcrito para *PVPPA1H<sup>+</sup>* (homólogo de *ATAVPI*) y una probable explicación a estas diferencias se deba a que las mediciones realizadas fueron hechas después de inducir la ausencia de fósforo por tres semanas y la planta en estas condiciones ya se encuentra cerca de la respuesta de adaptación. Además, las proteínas AtCAMTAs se ha demostrado que pueden regular la expresión de AtAVP1 e integrar señales durante el desarrollo o en condiciones de estrés (Finkler, *et al.*, 2007). En este trabajo observamos un incremento en el transcrito de *PvCAMTA*, principalmente en las hojas H1 y H4 pero nuestros datos no permiten establecer un correlación entre *PVPPA1H<sup>+</sup>* y la isoforma identificada de *PvCAMTA*.

El estudio por qRT-PCR de algunos genes involucrados en la respuesta a la deficiencia de fósforo y no únicamente los mensajeros de las PPasas, permitió una mejor percepción de los cambios



en la transcripción durante el estrés. Sin embargo, con la secuenciación masiva (RNAseq; que hace mediciones cuantitativas del nivel de expresión) se analizaron las hojas H3 y H5 de plantas control y en deficiencia de fósforo. Los resultados confirmaron que estas hojas responden de manera particular al estrés y que son numerosos los genes que están cambiando a consecuencia del tratamiento. El mayor número de cambios se dieron en la hoja H5 (más joven) con 1060 transcritos que cambiaron su expresión mientras que en la hoja H3 sólo se registraron 690 cambios. Para H5 ninguno de los mensajeros estudiados por qRT-PCR modificaron su expresión y de la lista de los genes que más se sobreexpresaron se identificaron muchas secuencias con función desconocida, varias proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos (de transferencia de fosfolípidos) y que pueden ser importantes durante condiciones de deficiencia de fósforo reemplazando los fosfolípidos de las membranas (por ejemplo; la membrana plasmática, tonoplasto y mitocondrias) con lípidos que no contiene fosfato (Tjellström *et al.*, 2008; 2010). También incrementan su expresión algunas proteínas anotadas como pertenecientes a la superfamilia de las histonas. En este sentido en la levadura el complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF y la histona acetiltransferasa Gcn5 son necesarios para la inducción completa de varias fosfatasas (PHO5, PHO8, PHO11, y PHO12) y del gen *PHO84* que codifica para un transportador de fosfato de alta afinidad (Santisteban *et al.*, 2000; Sudarsanam *et al.*, 2000. Barbaric *et al.*, 2007;. Wippo *et al.*, 2009). En la hoja H5 y de manera similar a los datos de sobreexpresión, un gran número de genes con función desconocida se subexpresan así como genes que codifican para las proteínas GH3 de respuesta auxina. Las proteínas GH3 de Arabidopsis se han observado que están involucradas en el crecimiento, desarrollo, fotomorfogénesis y en la señalización mediada por auxinas (Hsieh *et al.* 2000; Nakazawa *et al.*, 2001; Tepperman *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002; Takase *et al.*, 2004; Staswick *et al.*, 2005) por lo que una subexpresión de estas proteínas podría correlacionar con una disminución en el crecimiento de esta hoja

Los resultados del transcriptoma para la hoja H3 indican aumentos en la expresión de dos genes estudiados por qRT-PCR *PV4* y *parecida\_PvPPa4*, datos que confirman que la deficiencia de fósforo produce cambio en la expresión de las PPasas. La información del transcriptoma para esta hoja muestra una sobreexpresión de una gran cantidad de mensajeros relacionados con la homeostasis del fósforo como fosfatasas, *PVPS2*, *PVPS3* (*phosphate starvation 3*) por mencionar alguna. *PVPS2* está anotado como un miembro de la familia de las fosfatasas (*Pyridoxal phosphate phosphatase-related protein*) y su identificación se realizó mediante un BLAST. *PVPS3* codifica para un transportador y pertenece a la

familia de las permeasas de glicerol-3-fosfato. La familia comprende cinco miembros en *Arabidopsis* (AtG3Pp1-5). AtG3Pp1 y AtG3Pp2 muestran una inducción de 24 y 3 veces respectivamente en las raíces de plántulas en deficiencia de fósforo y con el uso de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) fusionada al promotor de AtG3Pp3, AtG3Pp4 y AtG3Pp5 y en condiciones de deficiencia de fósforo se observó una alta actividad de estas proteínas en raíces, hojas, anteras, estambres y silicuas, demostrando la importante función de esta familia de proteínas en la homeostasis del fósforo en la planta (Ramaiah *et al.*, 2011). Algunos de los genes que más se subexpresan en la hoja H3 están anotados como proteínas de resistencia a patógenos con un dominio NB-ARC (*nucleotide-binding domain* formado por APAF-1 *apoptotic protease-activating factor-1*, proteínas R y CED-4 *Caenorhabditis elegans death-4 protein*) (van der Biezen and Jones, 1998). El motivo NB-ARC de las proteínas R I-2 y Mi-1 de tomate son ATPasas funcionales y unen e hidrolizan específicamente ATP in vivo (Tameling *et al.*, 2002). La unión del nucleótido es requerida para activar la señal de defensa y el estado en donde el ATP está unido a la enzima representa la forma activa (Tameling *et al.*, 2006). Durante la deficiencia de fósforo los niveles de ATP disminuyen. Esto indirectamente puede afectar el mecanismo de activación de las proteínas de resistencia NB-ARC y aunque la proteína esté presente ésta no podría estar en su forma activa por lo que la regulación tendría que limitarse a nivel de la expresión del mensaje. De cualquier modo esto solo es una especulación y un análisis más detallado de estos mensajeros y sus correspondientes proteínas durante el estrés por deficiencia de fósforo podrían ayudar a resolver esta y otras interrogantes.

Se sabe que los cambios en la expresión del mRNA no siempre están acompañados con modificaciones en la traducción y la actividad de su correspondiente proteína. Para verificar si los cambios observados en los mensajes resultaban en cambios en la actividad de las pirofosfatasa, se usó la técnica de electroforesis nativa. Los zimogramas (Figura 20) resolvieron más de tres bandas de actividad y se observaron cambios tejido específicos en los niveles de actividad de algunas isoformas y en concordancia con los cambios observados en los distintos tejidos en la transcripción. No obstante, la identificación de las distintas isoformas en el gel no es posible debido al alto nivel de similitud por ejemplo en tamaño y punto isoeléctrico (PvPPa1, PvPPa4 y PvPPa6 tienen una masa molecular de 24.09 kD, 25.89 kD, 32.15 kD y un pI teórico de 5.72, 5.42, 6.37 respectivamente), y por la baja resolución de los zimogramas, por lo que no se pudo identificar las distintas bandas de actividad con sus correspondientes mRNAs. Más aún, el número de bandas observadas en los geles y la variación en

la actividad no excluyen la existencia de más isoformas o mecanismos de regulación postranscripcionales actuando sobre estas enzimas. La ausencia de cambios en la actividad, cuando se usaron extractos crudos totales, puede reflejarse por la ausencia de cambios en la actividad de la pirofosfatasa relacionada con el cloroplasto, conocida por ser el componente mayoritario (Weiner *et al.*, 1987) posiblemente PvPPa6 (Schulze *et al.*, 2004). En nuestros datos, el transcrito para esta proteína no cambia (Figura 14C). Futuras investigaciones podrán clarificar este punto. También, otras actividades con la capacidad para hidrolizar PPi pueden interferir con el ensayo de actividad en los extractos crudos, donde se tiene una mezcla de proteínas.

Los datos de las Figuras 20A y 20B revelan más de tres bandas de actividad pirofosfatasa y pueden representar las cuatro proteínas para los cuatro genes analizados en este trabajo (*PVPPA1*, *PVPPA4*, *PVPP6* y *PVPS2*) y/o los tres nuevos genes identificados por el análisis de secuenciación masiva (*PVPPA3*, parecida\_*PVPPA4*, parecida\_*PVPPA1*). Sin embargo, las bandas podrían también deberse la presencia de modificaciones postraduccionales de las pirofosfatasas ya identificadas.

## 9 Conclusiones

Los resultados presentes en este trabajo revelan cambios en la expresión y en la actividad de las pirofosfatasa de *Phaseolus vulgaris* durante un período largo de deficiencia de fósforo y sugiere la posible participación del pirofosfato en la supervivencia de la planta a estas condiciones de estrés. Tales variaciones en la expresión y/o la actividad señalan la existencia de mecanismos individuales de regulación para cada una de las pirofosfatasa e indica que no hay redundancia funcional de las distintas isoformas de pirofosfatasa en las plantas.

Además, los cambios en la expresión de las PPasas no fueron iguales en los diferentes tipos de tejido y dependen del estado de desarrollo de cada tejido analizado, así como de su posición en la planta. Esta información hace evidente las limitaciones de usar toda la parte aérea o las raíces (o en ocasiones la planta completa), porque el resultado es un promedio y cambios relevantes pueden ser enmascarados.

## 10 Figuras suplementarias

**Tabla Suplementaria 1. Oligonucleótidos (primer) utilizados en los experimentos de PCR cuantitativo.**

Nombre	Forward primer	Reverse primer	FOR	REV	Tamaño del producto	Eficiencia <sup>d</sup>
			Tamaño	Tamaño		
PvPS2 <sup>a</sup>	GCCCAAGTTTGAGGCTGAAAG	TCAAGTCCCACACCGGAAAGT	21	21	69	0.87
PvActin <sup>b</sup>	CACCGAGGCACCGCTTAATC	CGGCCACTAGCGTAAAGGGAA	20	21	126	1.00
PvPHR1	GGCAATGGAGGAAACAGTCA	AGCCACAGCATCAACGAAG	20	19	102	0.82
PvPPa1H <sup>†</sup>	CTTGTTTTGCCCCCTTCT	CGACGCTCTTTTCTCTCAAT	19	20	80	1.03
PvPPa1	TGGAATTCGGGTTTACCTCA	GCAACAGTTCTCCGTGACAG	20	20	71	1.01
PvPPa4	TCTCTCATCTTCTTCGCATC	TCCAATCTCAACCACACAA	21	20	144	0.96
PvPPa6	TCACAGAGACCAACGAGTCC	ACAACAACCCTCCCCAAAT	20	20	100	1.07
PvTIP41	TTTGGGAAGACTGCAAGGAT	AGTATGGGCTCTTGGATGC	20	20	61	1.17
PvEF1α <sup>c</sup>	AACTACCACCGGCCACTTGAT	AGCACCCAGGCATACTTGAAT	21	21	117	0.87
Pv4	GGTGCAGAGGCATAGATGG	GACGGTTCATTCCCAGCA	19	18	126	0.99
PvPT1	ACCCTCTCTCTGCCACAATC	CCACTACTCCACCAGCCAAA	20	20	114	0.91
PvCAMTA	CAGGCGTCACTCAAACATACC	GCTACAATGCCACTACACTCG	21	21	149	0.86

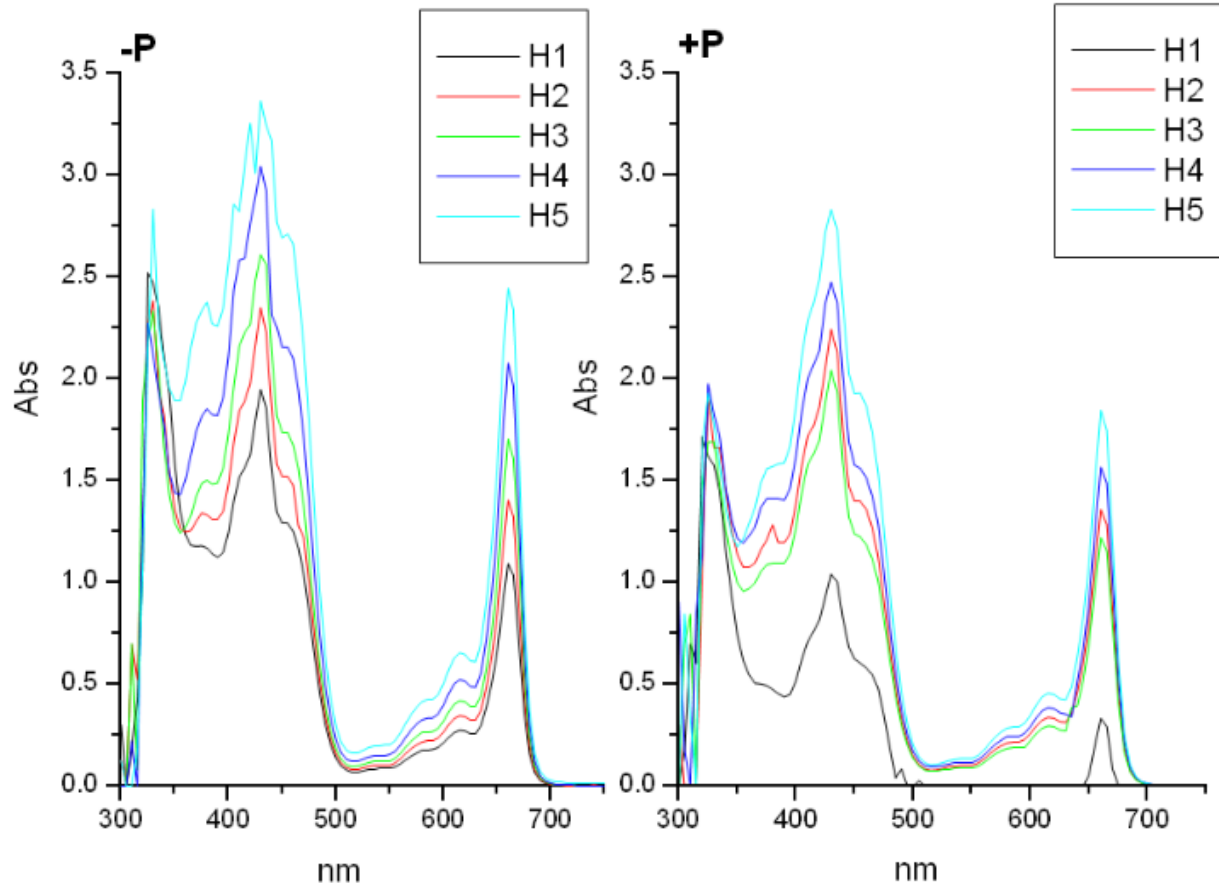
**Notas:**

<sup>a</sup>Secuencia tomada de: G. Hernández, M. Ramírez, O. Valdés-López, M. Tesfaye, M.A. Graham, T. Czechowski, A. Schlereth, M. Wandrey, A. Erban, F. Cheung, H.C. Wu, M. Lara, C.D. Town, J. Kopka, M.K. Udvardi, C.P. Vance, Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses, *Plant Physiol.* 144 (2007) 752–767.

<sup>b</sup>Secuencia tomada de: K. Wen, P. Seguin, M. St-Arnaud, S. Jabaji-Hare, Real-Time Quantitative RT-PCR of Defense-Associated Gene Transcripts of Rhizoctonia solani-Infected Bean Seedlings in Response to Inoculation with a Nonpathogenic Binucleate Rhizoctonia Isolate, *Phytopathology*, 95 (2005) 345-353.

<sup>c</sup>Secuencia tomada de: E.P. Meschini, F. A. Blanco, M. E. Zanetti, M. P. Beker, H. Küster, A. Pühler, O.M. Aguilar, Host Genes Involved in Nodulation Preference in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*)–*Rhizobium etli* Symbiosis Revealed by Suppressive Subtractive Hybridization, *Mol Plant Microbe Interact.* 21 (2008) 459-468.

<sup>d</sup>Eficiencia experimental a partir curvas de dilución de DNA (0.01 to 100 ng).



**Figura Suplementaria 1. Curvas espectrofotométricas de extractos cetónicos de hojas de plantas de frijol en condiciones de ausencia de fosfato (-P) e irrigadas con 1mM de fosfato (+P). La absorbancia se incrementa principalmente en las hojas mas jóvenes H5.**

**Tabla Suplementaria 2. ANOVA del contenido de fósforo para los diferentes tejidos en plantas -P y +P**

**Hojas**

Tratamiento (-P vs +P) F(1, 50) = 59.9 **p<0.000001** SS=744250.07 MSe=12429.18  
 Organos F(4, 50) = 0.706 **p<0.591827** SS=35083.91 MSe=12429.18  
 Fosforo\*Organo F(4, 50) = 1.66 **p<0.173232** SS=82698.70 MSe=12429.18

**Raíces**

ANOVA: Design 2 Between Subject Factors

Tratamiento (-P vs +P) F(1, 30) = 37.4 **p<0.000001** SS=56393.58 MSe=1508.83  
 Organos F(2, 30) = 0.619 **p<0.545130** SS=1868.44 MSe=1508.83  
 Fosforo\*Organo F(2, 30) = 0.535 **p<0.591206** SS=1614.17 MSe=1508.83

**Tallos**

ANOVA: Design 2 Between Subject Factors

Tratamiento (-P vs +P) F(1, 20) = 14.0 **p<0.001278** SS=26841.62 MSe=1914.35  
 Organo F(1, 20) = 1.52 **p<0.232399** SS=2903.56 MSe=1914.35  
 Fosforo\*Organo F(1, 20) = 1.35 **p<0.258786** SS=2586.28 MSe=1914.35

**Hojas -P**

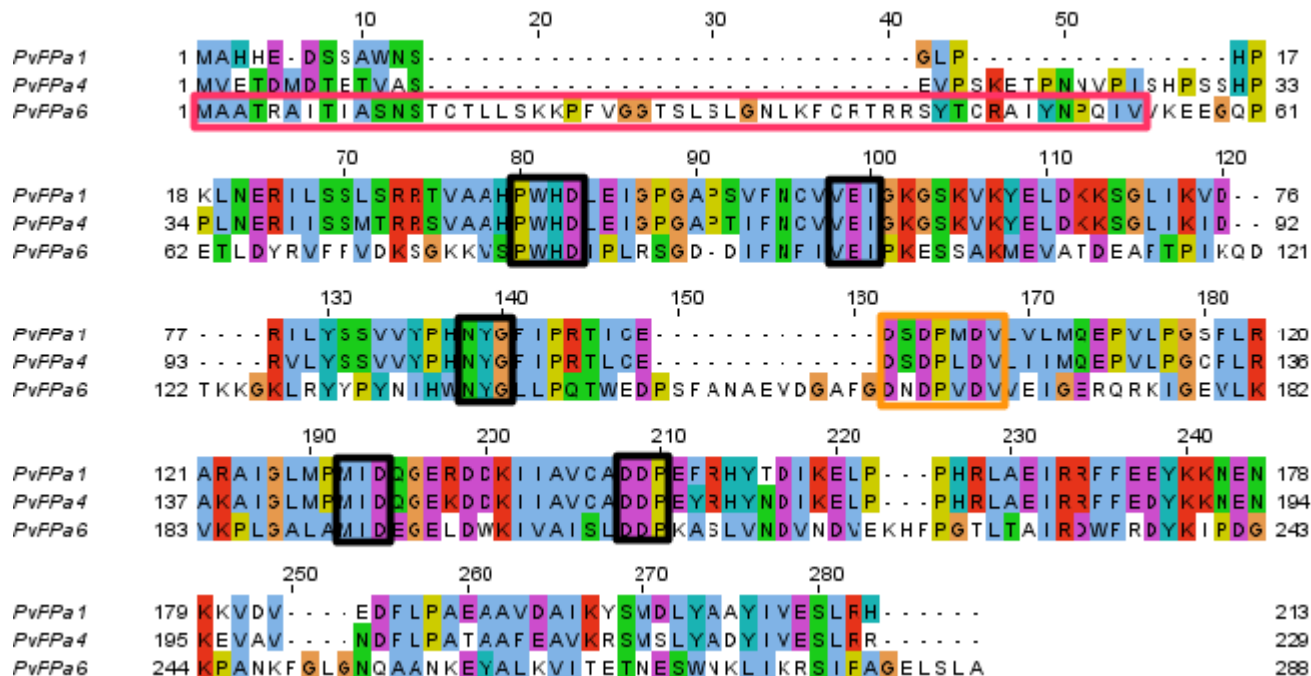
ANOVA: Design 1 Between Subject Factor

A F(4, 25) = 6.17 **p<0.001351** SS=59814.84 MSe=2424.20

**Hojas +P**

ANOVA: Design 1 Between Subject Factor

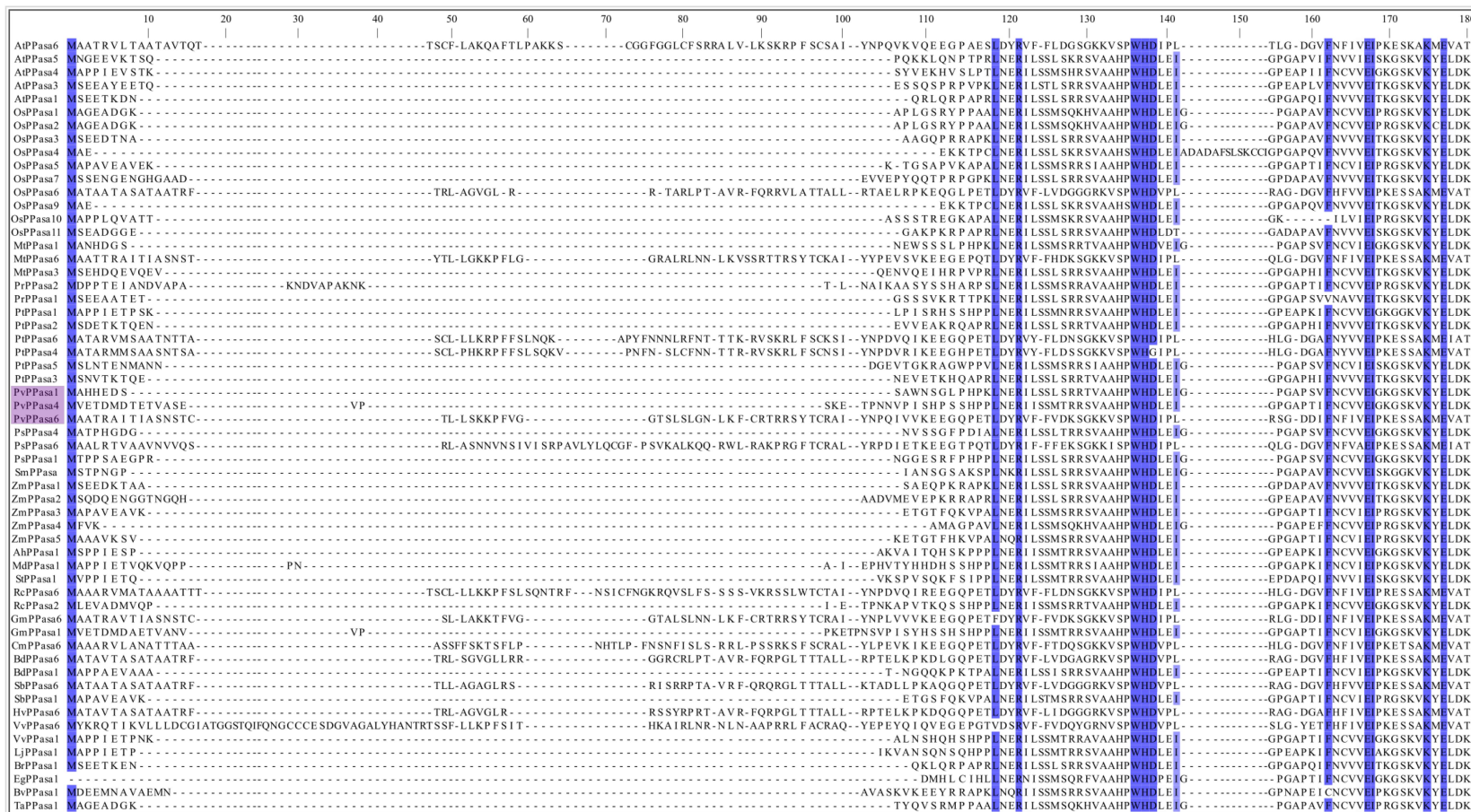
A F(4, 25) = 0.639 **p<0.639770** SS=57310.25 MSe=22431.95



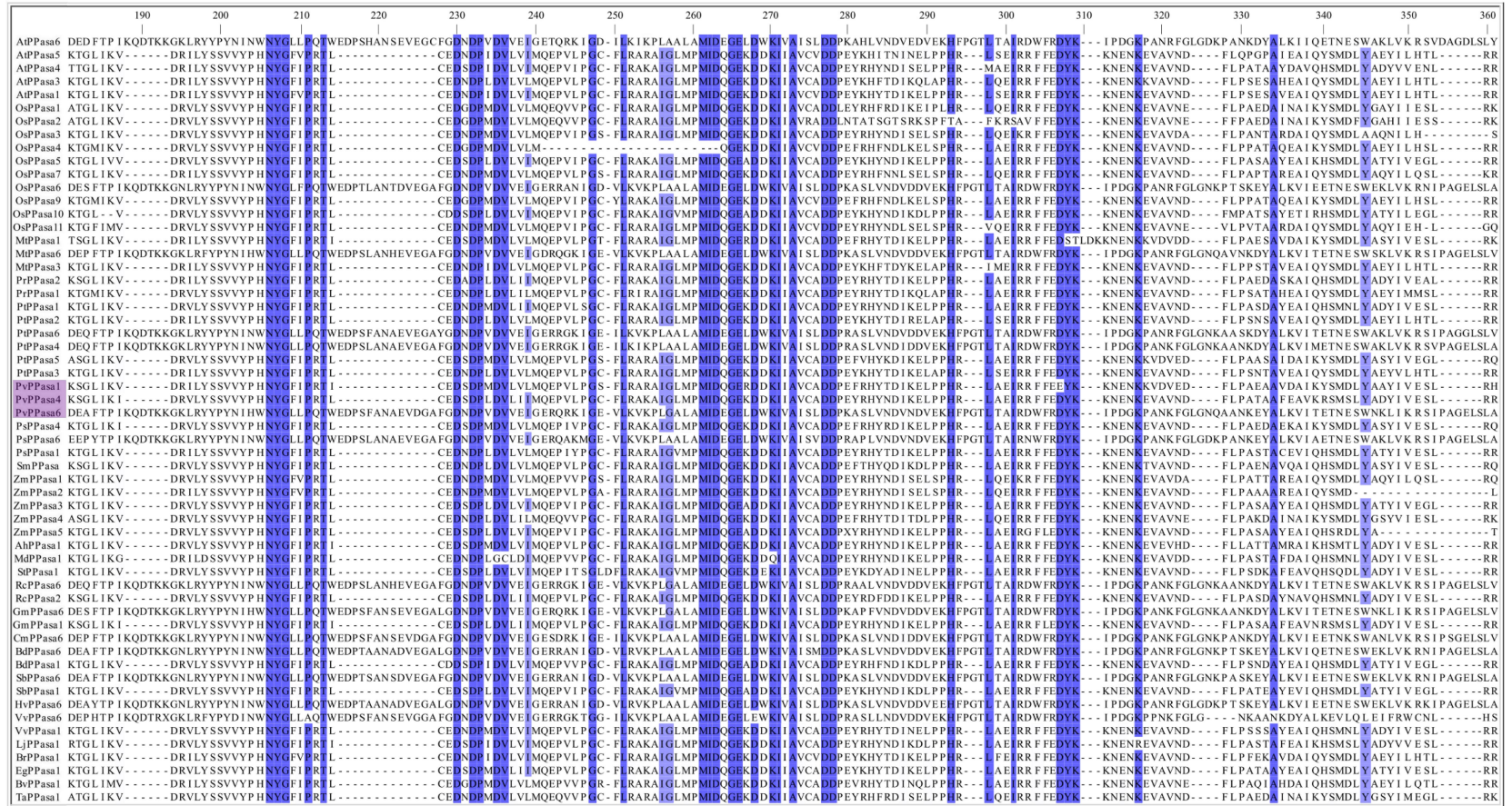
**Figura Suplementaria 2. Comparación en secuencia de aminoácidos de tres diferentes pirofosfatasa de *Phaseolus vulgaris*. Los genes de *Phaseolus vulgaris* se nombraron de acuerdo con su identidad con las pirofosfatasas de *Arabidopsis thaliana*. PvPPa1 y PvPPa4 comparten 79.1 %, PvPPa1 y PvPPa6 comparten 27.5% y PvPPa4 y PvPPa6 comparten 26.5% de identidad en su secuencia. En el recuadro rojo se muestra el probable péptido de transito al cloroplasto, en el recuadro naranja el motivo conservado en las pirofosfatasa inorgánicas rico en aspárticos importante para la catálisis y en los recuadros negros regiones conservadas en las tres pirofosfatasas.**

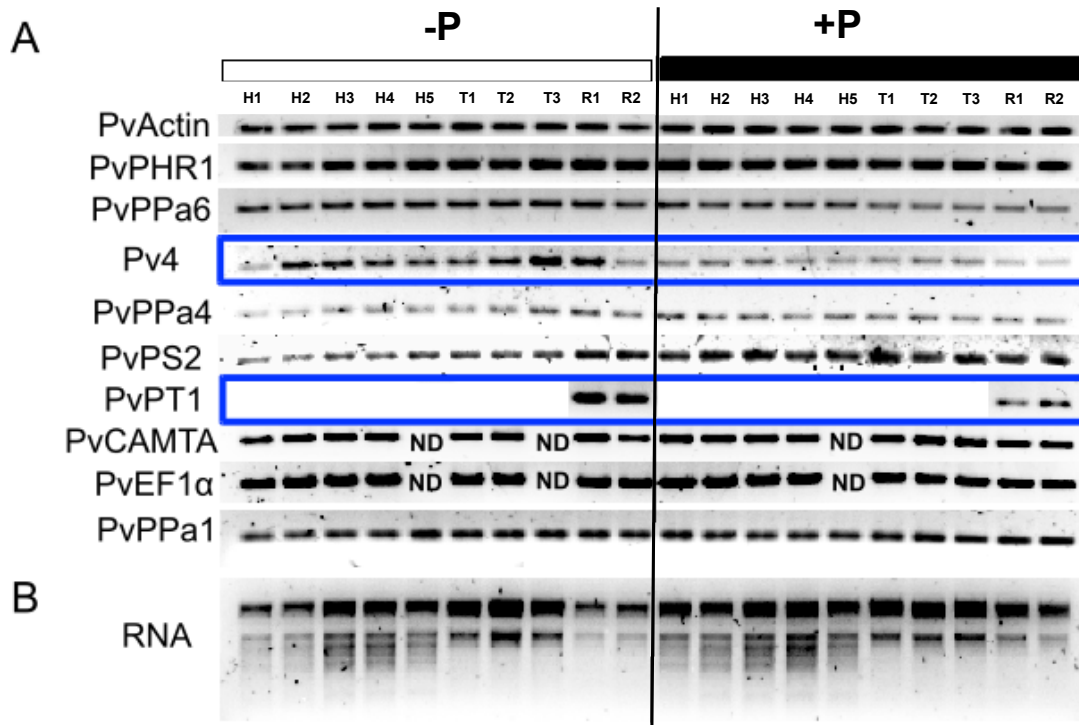


**Figura suplementaria 3 Alineamiento de 58 secuencias de aminoácidos de las pirofosfatases clásicas de plantas. Los residuos mejor conservados en todas las secuencias se muestran en azul. Las PPasas de frijol se muestran marcadas en un rectángulo morado. AtPPa, *Arabidopsis thaliana*; PvPPa, *Phaseolus vulgaris*; PtPPa, *Populus trichocarpa*; PsPPa, *Picea sitchensis*; MtPPa, *Medicago truncatula*; OsPPa, *Oryza sativa*; ZmPPa, *Zea mays*; AhPPa, *Arachis hypogaea*; MdPPa, *Malus domestica*; StPPa, *Solanum tuberosum*; SmPPa, *Selaginella moellendorffii*; StPPa, *Solanum tuberosum*; RcPPa, *Ricinus communis*; GmPPa, *Glycine max*; CmPPa, *Cucumis melo*; BdPPa, *Brachypodium distachyon*; SbPPa, *Sorghum bicolor*; HvPPa, *Hordeum vulgare*; VvPPa, *Vitis vinifera*; LjPPa, *Lotus japonicus*; BrPPa, *Brassica rapa*; EgPPa, *Elaeis guineensis*; BvPPa, *Beta vulgaris*; TaPPa *Triticum aestivum*.**

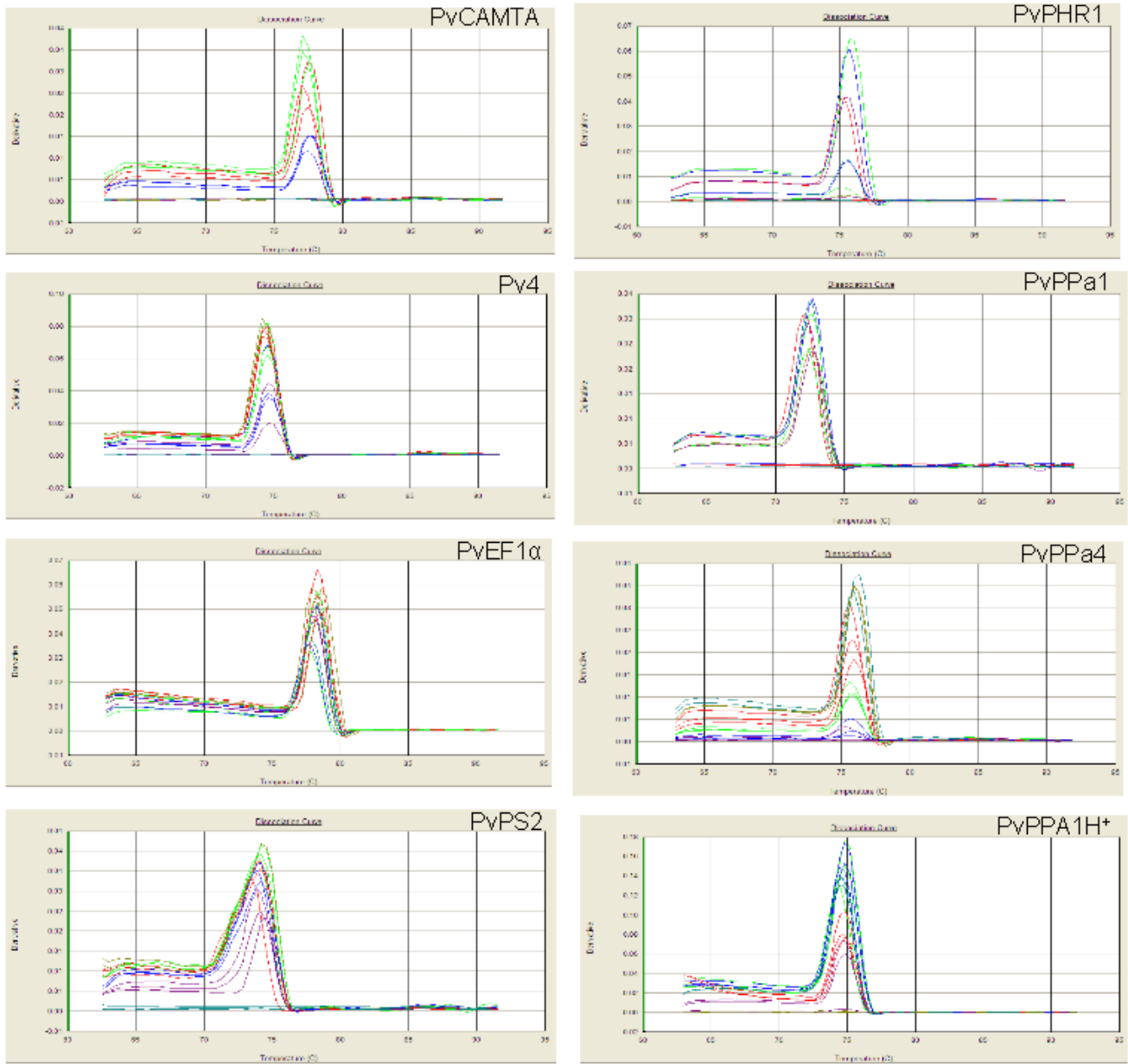


**Figura suplementaria 3 continuacion. Alineamiento de 58 secuencias de aminoácidos de las pirofosfatasa clásicas de plantas. Los residuos mejor conservados en todas las secuencias se muestran en azul. Las PPasas de frijol se muestran marcadas en un rectángulo morado. AtPPa, *Arabidopsis thaliana*; PvPPa, *Phaseolus vulgaris*; PtPPa, *Populus trichocarpa*; PsPPa, *Picea sitchensis*; MtPPa, *Medicago truncatula*; OsPPa, *Oryza sativa*; ZmPPa, *Zea mays*; AhPPa, *Arachis hypogaea*; MdPPa, *Malus domestica*; StPPa, *Solanum tuberosum*; SmPPa, *Selaginella moellendorffii*; SPPa, *Solanum tuberosum*; RcPPa, *Ricinus communis*; GmPPa, *Glycine max*; CmPPa, *Cucumis melo*; BdPPa, *Brachypodium distachyon*; SbPPa, *Sorghum bicolor*; HvPPa, *Hordeum vulgare*; VvPPa, *Vitis vinifera*; LjPPa, *Lotus japonicus*; BrPPa, *Brassica rapa*; EgPPa, *Elaeis guineensis*; BvPPa, *Beta vulgaris*; TaPPa *Triticum aestivum*.**

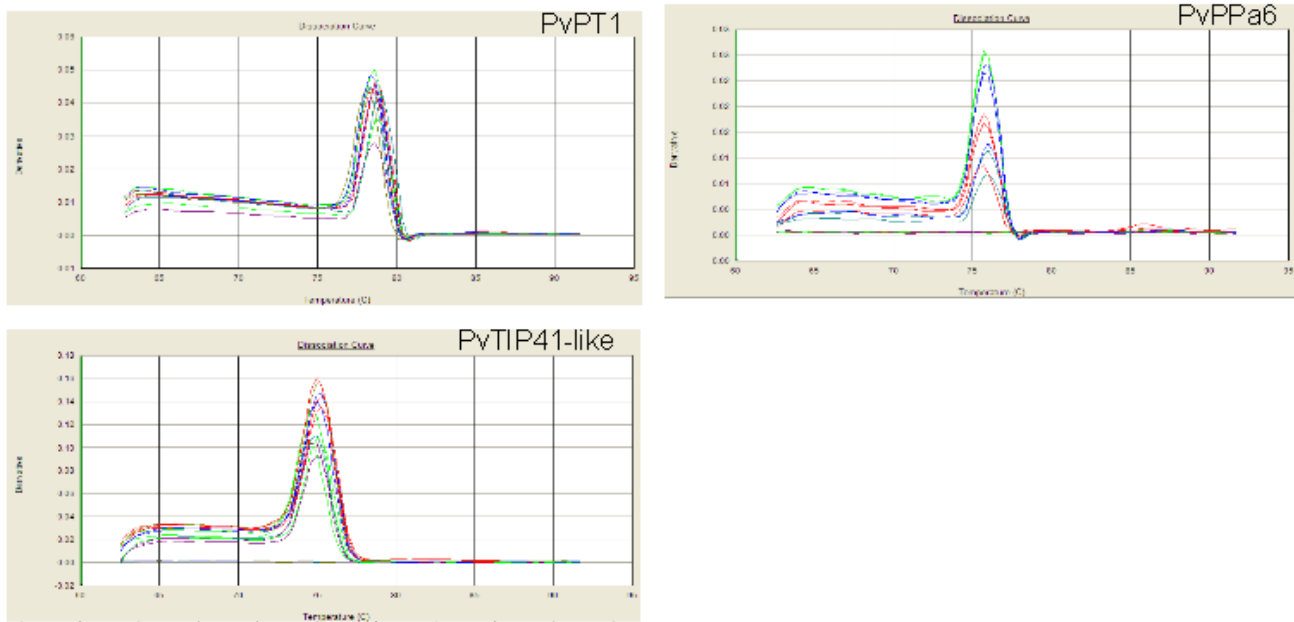




**Figura Suplementaria 4. Análisis de expresión y especificidad de los oligonucleótidos de varios genes de Phaseolus vulgaris en condiciones de deficiencia de fosfato (-P) o condiciones control (+P). (A) Dos genes responden a condiciones bajas de fosfato (PvPT1 y Pv4) incrementando sus niveles de mRNA (cajas azules). La reacción de amplificación por RT-PCR se realizaron con los mismos oligonucleótidos usados para el RT-PCR tiempo real y los productos se revisaron en geles de agarosa al 3%. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla suplementaria 1. Solo un producto fue amplificado con estos oligonucleótidos. Los tejidos se agruparon como se indica en la Figura 8: hojas (H1-H5), tallos (T1-T3) y raíces(R1 y R2). ND no determinado B) La integridad del RNA se verificó en geles con formaldehído a 1% de agarosa (por limitaciones de espacio solo se muestra la parte del gel donde se detectó la banda) pares de oligonucleótidos para PvPPa4 fueron rediseñados por amplificar dos bandas. En la figura se muestra la amplificación de PvPPa4 con los oligonucleótidos correctos.**



**Figura Suplementaria 5. Análisis de las curvas de disociación realizadas en el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Bioystem™) Cada panel muestra la formación de una sola molécula de DNA. PvCAMTA, factor transcripcional dependiente de calmodulina; Pv4 homologo no codificante de At4; PHR1, MYB un regulador positivo de genes implicados en el transporte del fosfato; *PVPPA1*, pirofosfatasa soluble inorgánica 1; *PVPPA4*, pirofosfatasa inorgánica soluble 4; PvEF1 $\alpha$  factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$ ; PvPS2, gen numero 2 inducido por bajos niveles de fósforo; PvPPaH<sup>+</sup>, pirofosfatasa de protones de la membrana vacuolar. Las diferentes gráficas corresponden a concentraciones distintas de la molécula de cDNA. En el eje de las abscisas se gráfico la fluorescencia y en el eje de las ordenadas la temperatura.**



**Figura Suplementaria 5. Análisis de los oligonucleótidos con curvas de disociación realizadas en el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Bioystem™) Cada panel muestra la formación de una sola molécula de DNA. PvPT1, transportado 1 de fosfato de alta afinidad; *PVPPA6* pirofosfatasa inorgánica soluble 6 de *Phaseolus vulgaris*; PvTIP41-like, gen de referencia. Las diferentes gráficas corresponden a concentraciones distintas de la molécula de cDNA. En el eje de las abscisas se gráfico la fluorescencia y en el eje de las ordenadas la temperatura.**

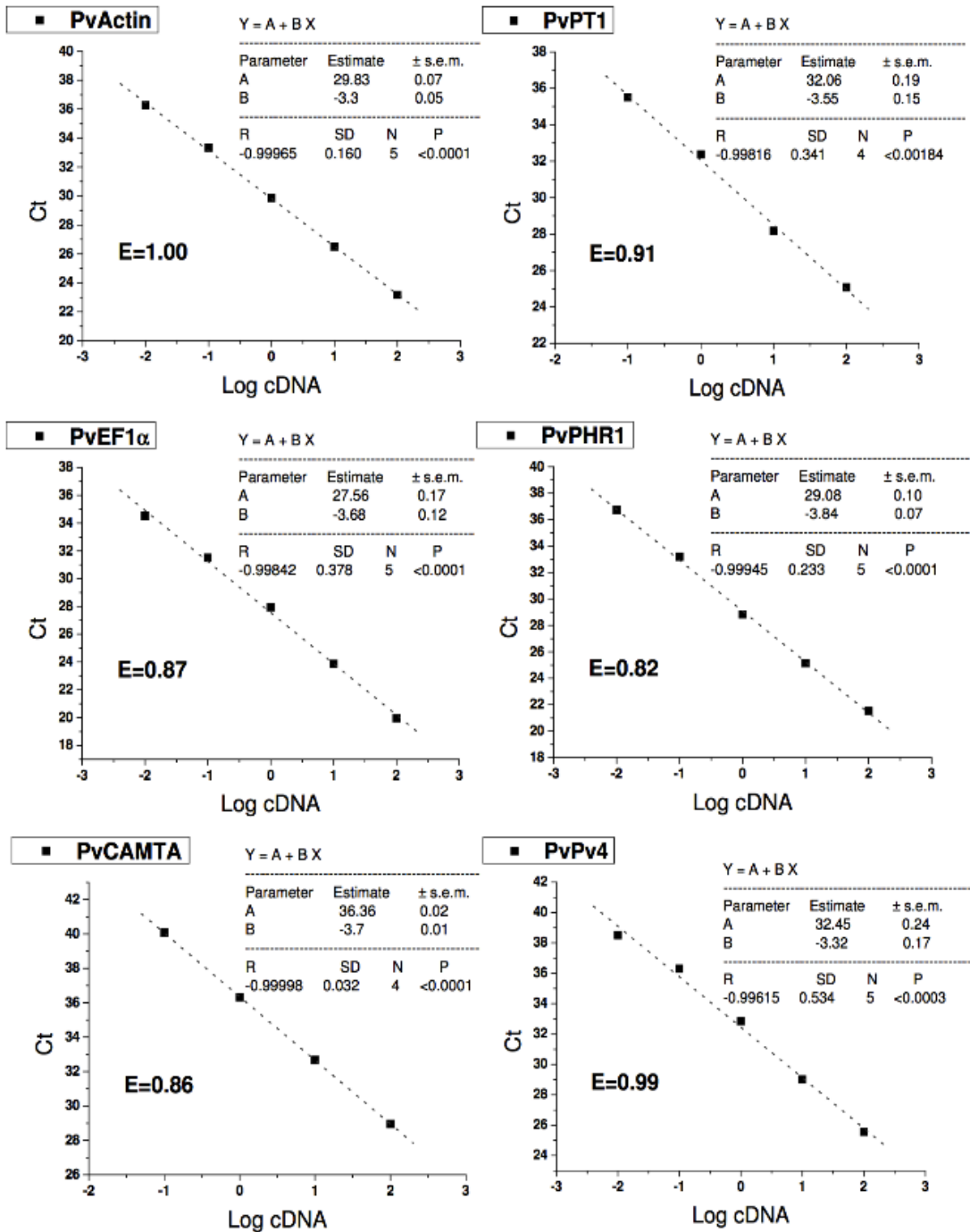
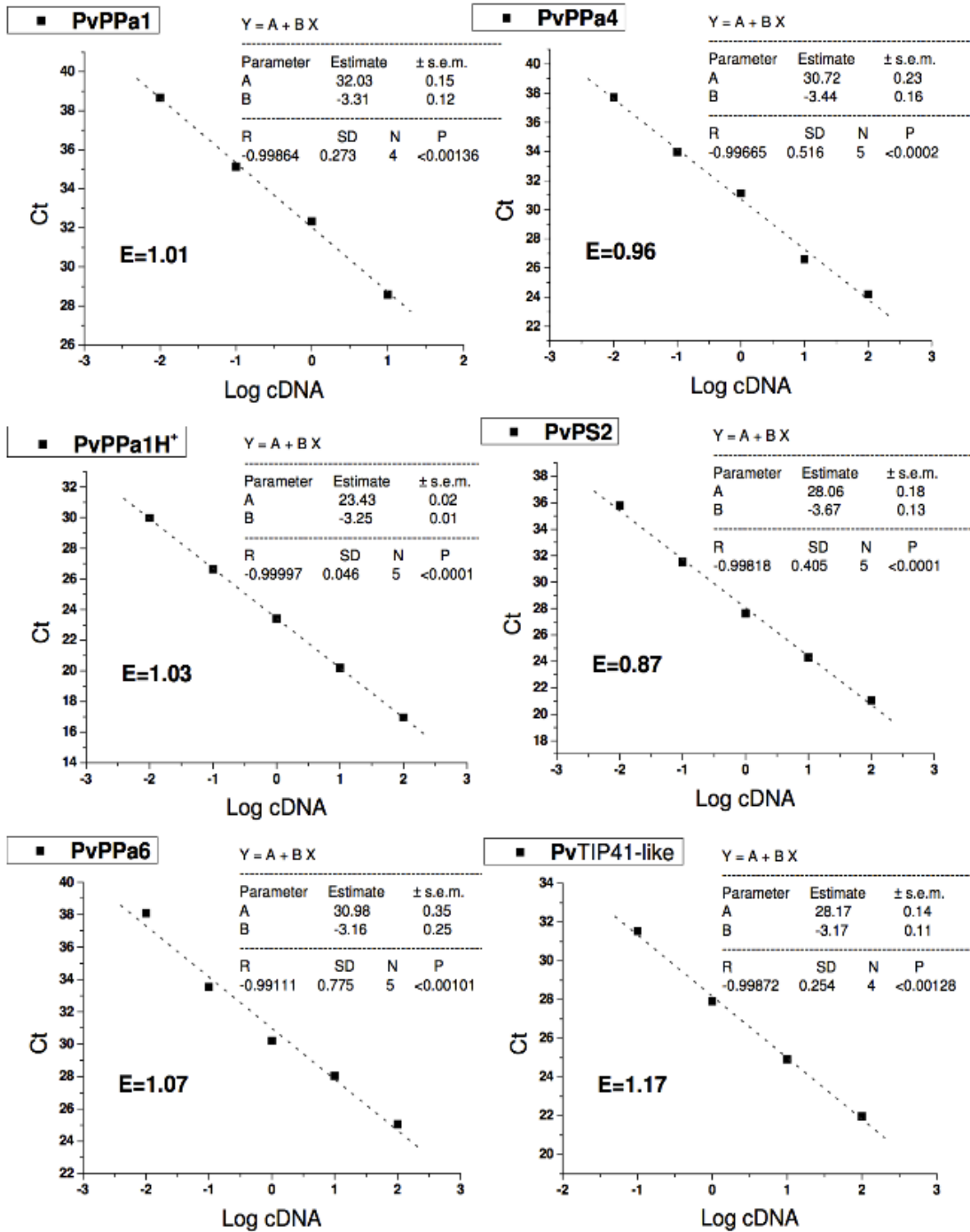
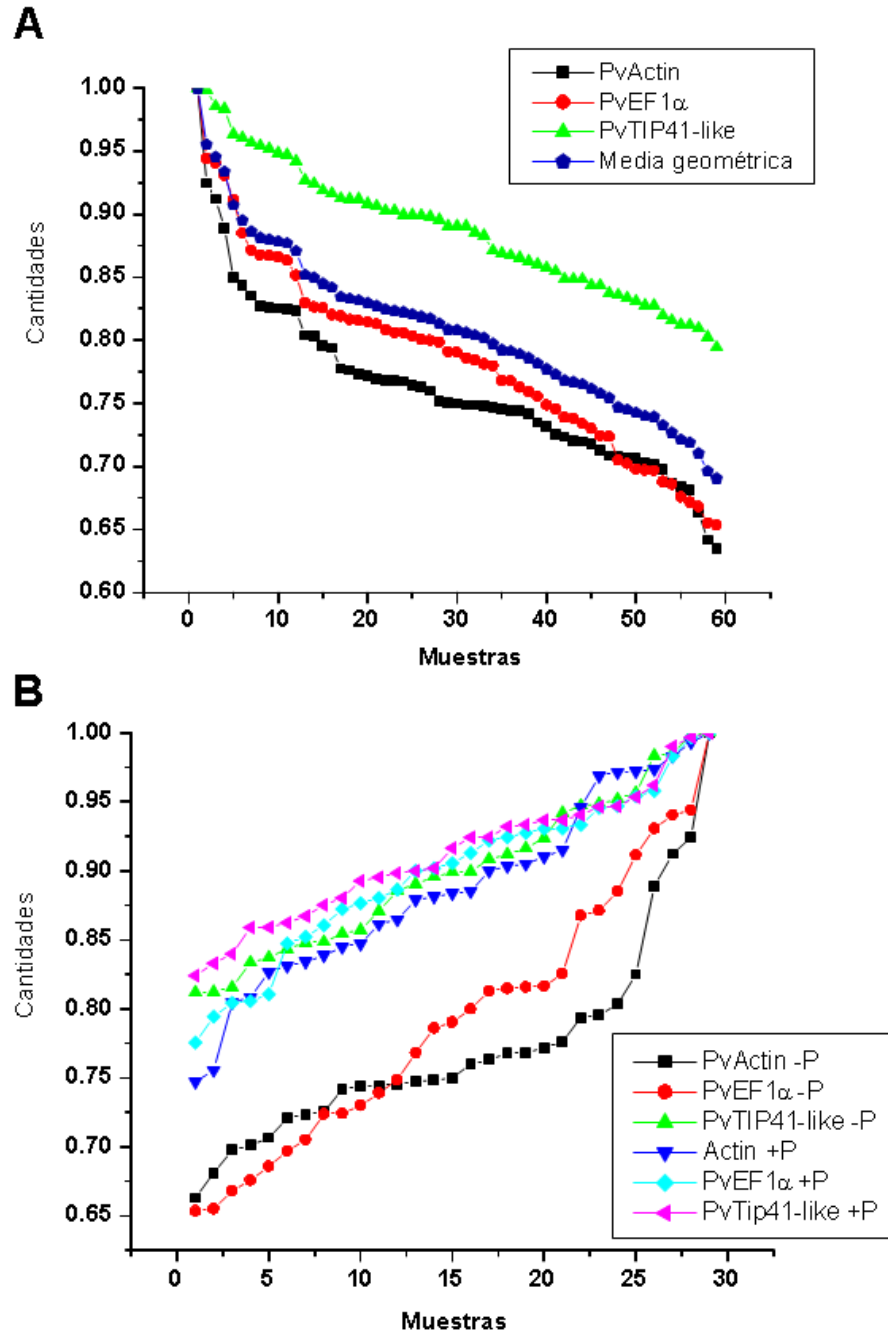


Figura Suplementaria 6. Determinación de la eficiencia (E) de amplificación de los oligonucleótidos. Los experimentos se realizaron en un equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem™). Las concentraciones de cDNA usadas para generar las curvas fueron de 0.01ng a 100ng y el protocolo se realizó conforme las recomendaciones del fabricante.

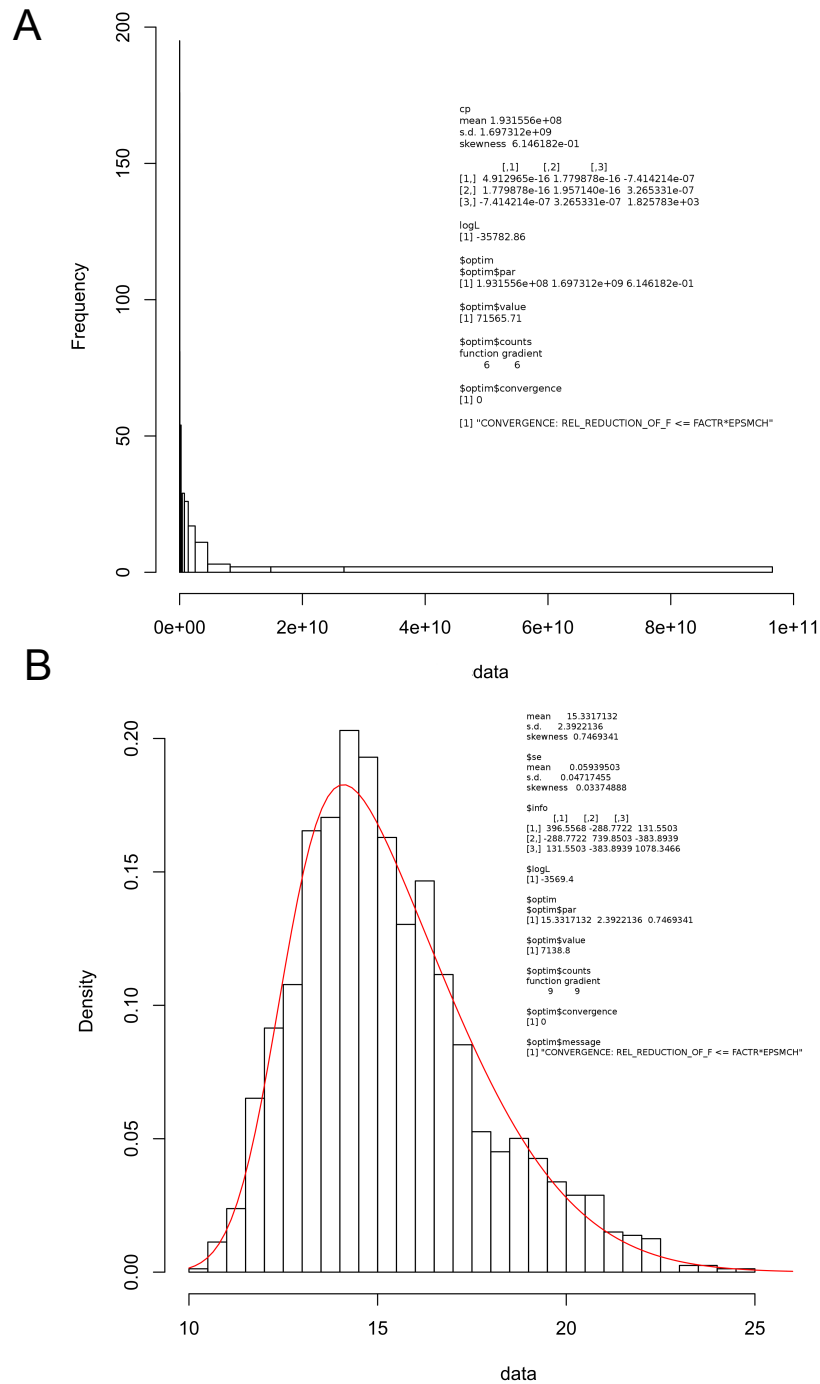


**Figura Suplementaria 6. Determinación de la eficiencia (E) de amplificación de los oligonucleótidos. Los experimentos se realizaron en un equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem™). Las concentraciones de cDNA usadas para generar las curvas fueron de 0.01ng a 100ng y el protocolo se realizó conforme las recomendaciones del fabricante.**

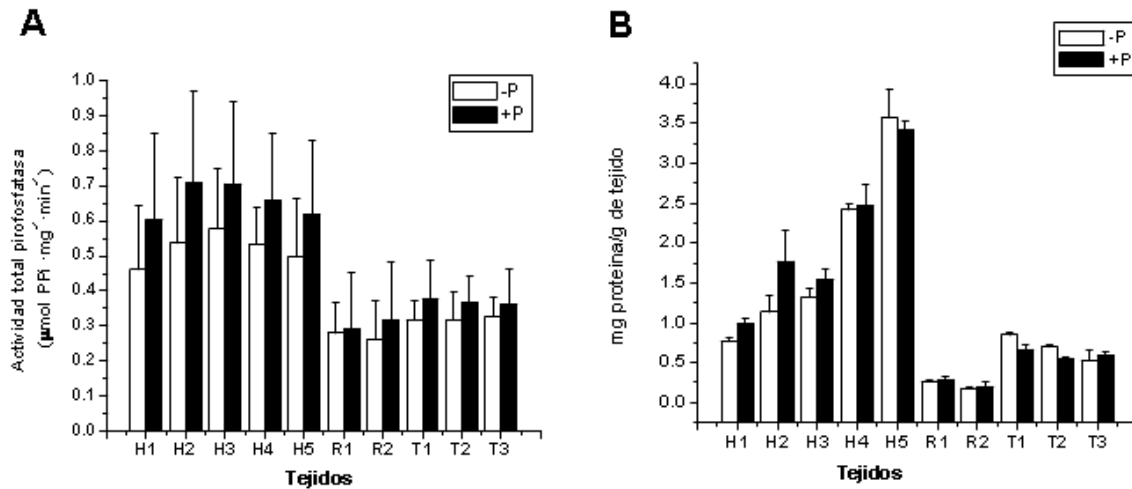


**Figura Suplementaria 7. Medición de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia. El valor de Ct mas alto para cada gen se estableció con un valor de 1. (A) Variación de la expresión de los cDNAs para PvActina PvEF1 $\alpha$  y PvTIP41-like, en un conjunto de 60 tejidos (de los estudiados) de plantas de frijol que incluían los dos tratamientos: en condiciones de ausencia de fosfato (-P) y con 1mM de fosfato (+P). (B) Variación de la expresión de los mismos genes pero los tratamientos -P y +P se analizaron de manera separada. PvActina y PvEF1 $\alpha$  en condiciones de estrés de fósforo observaron altos niveles de variación. Los valores de estabilidad de la expresión (M) para cada gen se calculó con el programa GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002): PvActina, 0.095; PvEF1 $\alpha$ , 0.091; PvTip41-like, 0.083.**





**Figura Suplementaria 8. Histograma de frecuencias de los valores de (A)  $E^{ct}$  y (B) de  $\log(E^{ct})$  de todos los genes analizados por q RT-PCR.**



### ANOVA Actividad PPasa

#### Hojas

ANOVA: Design 2 Between Subject Factors

Tratamiento  $F(1,80) = 10.4$   $p < 0.001807$   $SS = 1.68$   $MSe = 0.16$

Organo  $F(4,80) = 0.913$   $p < 0.460497$   $SS = 0.59$   $MSe = 0.16$

Tratamiento\*Organo  $F(4,80) = 0.046$   $p < 0.995848$   $SS = 0.03$   $MSe = 0.16$

#### Tallos

ANOVA: Design 2 Between Subject Factors

Tratamiento  $F(1,48) = 4.39$   $p < 0.041539$   $SS = 0.12$   $MSe = 0.03$

Organo  $F(2,48) = 0.019$   $p < 0.981248$   $SS = 0.01$   $MSe = 0.03$

Tratamiento\*Organo  $F(2,48) = 0.104$   $p < 0.901625$   $SS = 0.01$   $MSe = 0.03$

#### Raíces

ANOVA: Design 2 Between Subject Factors

Tratamiento  $F(1,32) = 0.576$   $p < 0.453295$   $SS = 0.04$   $MSe = 0.07$

Organo  $F(1,32) = 0.004$   $p < 0.947586$   $SS = 0.01$   $MSe = 0.07$

Tratamiento\*Organo  $F(1,32) = 0.215$   $p < 0.645670$   $SS = 0.02$   $MSe = 0.0$

### ANOVA Contenido de Proteína

#### Hojas

ANOVA: Design 2 Between Subject Factors

Tratamiento  $F(1,40) = 1.51$   $p < 0.226024$   $SS = 0.22$   $MSe = 0.14$

Organo  $F(4,40) = 72.8$   $p < 0.000001$   $SS = 41.64$   $MSe = 0.14$

Tratamiento\*Organo  $F(4,40) = 2.41$   $p < 0.065317$   $SS = 1.38$   $MSe = 0.14$

#### Tallos

ANOVA: Design 2 Between Subject Factors

Tratamiento  $F(1,36) = 5.03$   $p < 0.031138$   $SS = 0.55$   $MSe = 0.11$

Organo  $F(2,36) = 0.478$   $p < 0.624194$   $SS = 0.10$   $MSe = 0.11$

Tratamiento\*Organo  $F(2,36) = 0.173$   $p < 0.841681$   $SS = 0.04$   $MSe = 0.11$

#### Raíces

ANOVA: Design 2 Between Subject Factors

Tratamiento  $F(1,20) = 3.96$   $p < 0.060480$   $SS = 0.19$   $MSe = 0.05$

Organo  $F(1,20) = 2.04$   $p < 0.169064$   $SS = 0.10$   $MSe = 0.05$

Tratamiento\*Organo  $F(1,20) = 0.066$   $p < 0.800434$   $SS = 0.01$   $MSe = 0.05$

**Figura Suplementaria 9 Actividad total pirofosfatasa dependiente de magnesio y concentración de proteína en extractos crudos de *Phaseolus vulgaris*. Las plantas fueron cultivadas por tres semanas en suficiencia de fósforo (+P) o en ausencia de fósforo (-P). Los tejidos estudiados se agruparon como se muestra en la Figura 8. (A) La actividad pirofosfatasa específica total a 25°C en ausencia de  $MgCl_2$  se restó de la actividad en presencia de 5mM de  $MgCl_2$ . (B) Concentración de proteína en los tejidos estudiados, la medición se describe en la sección de métodos. Se muestra debajo de las gráficas los análisis de varianza para la actividad total PPasas y para el contenido de proteína total. Las hojas, tallos y raíces se analizaron en grupos separados.**

**Tabla Suplementaria 3. Los 90 genes que mas se sobreexpresan del análisis de secuenciación masiva para la hoja H5 en estrés de fósforo**

No.	Descripción	Log
1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	4.135
2	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	4.081
3	Plant protein 1589 of unknown function	3.856
4	HSP20-like chaperones superfamily protein	3.549
5	squamosa promoter binding protein-like 3	3.283
6	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	2.913
7	Plant protein 1589 of unknown function	2.858
8	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	2.847
9	Plant protein 1589 of unknown function	2.819
10	ferritin 4	2.775
11	MLP-like protein 43	2.716
12	MLP-like protein 43	2.696
13	isocitrate lyase	2.644
14	squamosa promoter-binding protein-like 12	2.639
15	nitrate transporter 1:2	2.619
16	Unknown function	2.529
17	HSP20-like chaperones superfamily protein	2.519
18	cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 5	2.509
19	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein	2.493
20	MLP-like protein 43	2.484
21	Gibberellin-regulated family protein	2.470
22	protochlorophyllide oxidoreductase A	2.451
23	Unknown function	2.448
24	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	2.445
25	cellulose synthase-like B4	2.412
26	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	2.406
27	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	2.405
28	nicotinamidase 1	2.394
29	UDP-glucosyl transferase 85A2	2.394
30	Glucose-1-phosphate adenyltransferase family protein	2.370
31	GATA type zinc finger transcription factor family protein	2.356
32	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	2.341
33	MLP-like protein 43	2.335
34	Histone superfamily protein	2.322
35	Histone superfamily protein	2.317
36	Glycosyl hydrolase superfamily protein	2.298
37	cytochrome-c oxidases;electron carriers	2.298
38	aldehyde dehydrogenase 2C4	2.292
39	lipoxygenase 1	2.282
40	O-methyltransferase family protein	2.282
41	drought-induced 21	2.276
42	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	2.247
43	Unknown function	2.201
44	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	2.191
45	heat shock protein 21	2.185

**Tabla Suplementaria 3 continuación. Los 90 genes que mas se sobreexpresan del análisis de secuenciación masiva para la hoja H5 en estrés de fósforo**

No.	Descripción	Log
46	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	2.181
47	cytokinin oxidase/dehydrogenase 6	2.174
48	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	2.171
49	BCL-2-associated athanogene 6	2.170
50	ATP-citrate lyase A-3	2.166
51	Protein kinase superfamily protein	2.162
52	Unknown function	2.159
53	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 2	2.151
54	O-methyltransferase 1	2.134
55	photosystem II light harvesting complex gene 2.1	2.128
56	Unknown function	2.124
57	alpha-crystallin domain 32.1	2.122
58	aldehyde dehydrogenase 3F1	2.121
59	Pectin lyase-like superfamily protein	2.111
60	Duplicated homeodomain-like superfamily protein	2.105
61	Protein kinase superfamily protein	2.099
62	ethylene-dependent gravitropism-deficient and yellow-green-like 3	2.098
63	Methylenetetrahydrofolate reductase family protein	2.097
64	Unknown function	2.077
65	Acid phosphatase/vanadium-dependent haloperoxidase-related protein	2.069
66	Protein phosphatase 2A regulatory B subunit family protein	2.054
67	glycine-rich protein	2.026
68	MLP-like protein 43	2.026
69	Histone superfamily protein	2.023
70	phosphate starvation-induced gene 3	2.023
71	Serine/threonine-protein kinase WNK (With No Lysine)-related	2.010
72	Subtilase family protein	2.006
73	Unknown function	2.005
74	light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3	2.005
75	Dormancy/auxin associated family protein	1.990
76	Cytochrome P450 superfamily protein	1.987
77	light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3	1.987
78	Histone superfamily protein	1.981
79	Protein of unknown function (DUF506)	1.978
80	Unknown function	1.958
81	Ankyrin repeat family protein	1.954
82	Unknown function	1.951
83	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	1.950
84	cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 4	1.950
85	Homeobox-leucine zipper protein 4 (HB-4) / HD-ZIP protein	1.942
86	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	1.938
87	expansin B3	1.927
88	Major facilitator superfamily protein	1.927
89	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	1.926
90	Ovate family protein	1.920

**Tabla Suplementaria 4. Los 90 genes que mas se subexpresan del análisis de secuenciación masiva para la hoja H5 en estrés de fósforo.**

No.	Descripción	Log
1	Zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	-7.531
2	ribonuclease 1	-6.720
3	Unknown function	-6.634
4	methionine gamma-lyase	-5.849
5	nitrate transporter 1.5	-5.584
6	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	-5.417
7	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	-5.399
8	oxophytodienoate-reductase 3	-5.349
9	Unknown function	-5.057
10	lipxygenase 2	-4.846
11	Unknown function	-4.777
12	allene oxide cyclase 4	-4.666
13	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein	-4.649
14	BON association protein 2	-4.587
15	Unknown function	-4.555
16	aldehyde dehydrogenase 10A8	-4.493
17	allene oxide synthase	-4.460
18	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family protein	-4.381
19	SLAC1 homologue 3	-4.248
20	Protein kinase superfamily protein	-4.240
21	myb domain protein 116	-4.214
22	Gibberellin-regulated family protein	-4.204
23	Peroxidase superfamily protein	-4.194
24	Unknown function	-4.151
25	Unknown function	-4.134
26	Unknown function	-4.125
27	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-4.123
28	Unknown function	-4.106
29	Unknown function	-4.074
30	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	-4.057
31	copper ion binding;electron carriers	-4.046
32	pleiotropic drug resistance 12	-4.032
33	highly ABA-induced PP2C gene 3	-3.999
34	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 15	-3.987
35	Uncharacterised protein family (UPF0497)	-3.920
36	Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein	-3.911
37	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-3.890
38	Unknown function	-3.865
39	copper ion binding;electron carriers	-3.852
40	B12D protein	-3.839
41	tonoplast intrinsic protein 1;3	-3.817
42	plasma membrane intrinsic protein 1;4	-3.795
43	Protein of unknown function (DUF567)	-3.791
44	Peroxidase superfamily protein	-3.770
45	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-3.763

**Tabla Suplementaria 4 continuación. Los 90 genes que mas se subexpresan del análisis de secuenciación masiva para la hoja H5 en estrés de fósforo.**

46	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-3.731
47	Late Embryogenesis Abundant 4-5	-3.715
48	Ribosomal protein L16p/L10e family protein	-3.676
49	Chlorophyll A-B binding family protein	-3.618
50	Zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	-3.615
51	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein	-3.528
52	Raffinose synthase family protein	-3.526
53	Zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	-3.475
54	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	-3.448
55	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein	-3.442
56	Rubredoxin-like superfamily protein	-3.421
57	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	-3.392
58	polygalacturonase inhibiting protein 1	-3.374
59	flavanone 3-hydroxylase	-3.348
60	Major facilitator superfamily protein	-3.321
61	purple acid phosphatase 24	-3.313
62	Protein phosphatase 2C family protein	-3.302
63	hydroxy methylglutaryl CoA reductase 1	-3.276
64	terpene synthase 14	-3.270
65	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	-3.256
66	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	-3.239
67	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	-3.229
68	Major facilitator superfamily protein	-3.195
69	late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein, putative	-3.160
70	Copper amine oxidase family protein	-3.119
71	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-3.105
72	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	-3.102
73	xyloglucan endotransglycosylase 6	-3.096
74	Unknown function	-3.064
75	Fatty acid hydroxylase superfamily	-3.048
76	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	-3.034
77	Auxin-responsive family protein	-3.015
78	O-fucosyltransferase family protein	-2.970
79	Chaperonin-like RbcX protein	-2.948
80	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	-2.945
81	glutathione S-transferase TAU 8	-2.941
82	NADH-dependent glutamate synthase 1	-2.941
83	bidirectional amino acid transporter 1	-2.919
84	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9	-2.915
85	Auxin-responsive GH3 family protein	-2.911
86	Unknown function	-2.909
87	formate dehydrogenase	-2.885
88	Unknown function	-2.861
89	Unknown function	-2.852
90	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	-2.840

**Tabla Suplementaria 5. Los 90 genes que mas se sobreexpresan del análisis de secuenciación masiva para la hoja H3 en estrés de fósforo.**

No.	Descripción	Log
1	SPX domain gene 2	6.226
2	Unknown function	5.398
3	senescence-related gene 3	5.356
4	sulfotransferase 2A	5.076
5	purple acid phosphatase 17	4.774
6	S-locus lectin protein kinase family protein	4.743
7	Pyridoxal phosphate phosphatase-related protein	4.531
8	CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein	4.504
9	Pyridoxal phosphate phosphatase-related protein	4.283
10	Pyridoxal phosphate phosphatase-related protein	4.200
11	Pyridoxal phosphate phosphatase-related protein	4.180
12	SPX domain gene 1	4.117
13	SPX domain gene 3	4.035
14	phosphatidic acid phosphohydrolase 2	3.720
15	Protein phosphatase 2C family protein	3.709
16	HPT phosphotransmitter 4	3.664
17	Unknown function	3.603
18	Pyridoxal phosphate phosphatase-related protein	3.310
19	Protein of unknown function (DUF506)	3.268
20	Wall-associated kinase family protein	3.182
21	Protein of unknown function (DUF506)	3.055
22	monogalactosyldiacylglycerol synthase 2	3.044
23	SPX domain gene 2	3.020
24	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	3.020
25	Acid phosphatase/vanadium-dependent haloperoxidase-related protein	3.003
26	Protein of unknown function (DUF1262)	2.988
27	Unknown function	2.968
28	Nodulin MtN3 family protein	2.937
29	heat shock protein 21	2.887
30	Unknown function	2.844
31	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	2.817
32	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	2.806
33	Plant protein 1589 of unknown function	2.750
34	sulfotransferase 2A	2.590
35	wall associated kinase-like 2	2.555
36	Unknown function	2.552
37	Unknown function	2.512
38	purple acid phosphatase 8	2.480
39	Auxin efflux carrier family protein	2.480
40	sulfoquinovosyldiacylglycerol 2	2.478
41	MLP-like protein 43	2.474
42	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	2.441
43	PYR1-like 12	2.435
44	Unknown function	2.434
45	Unknown function	2.434

**Tabla Suplementaria 5 continuación. Los 90 genes que mas se sobreexpresan del análisis de secuenciación masiva para la hoja H3 en estrés de fósforo.**

No.	Descripción	Log
46	Unknown function	2.407
47	Unknown function	2.395
48	starch synthase 2	2.378
49	wall associated kinase-like 2	2.361
50	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 32	2.338
51	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	2.338
52	zinc induced facilitator-like 1	2.332
53	Auxin efflux carrier family protein	2.331
54	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase protein	2.326
55	Phosphotyrosine protein phosphatases superfamily protein	2.323
56	PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein	2.315
57	Unknown function	2.314
58	pyrophosphorylase 4	2.313
59	pyrophosphorylase 4	2.308
60	PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein	2.306
61	RING/U-box superfamily protein	2.298
62	Phosphotyrosine protein phosphatases superfamily protein	2.268
63	S-locus lectin protein kinase family protein	2.266
64	Cellulose-synthase-like C12	2.263
65	phospholipase D P1	2.233
66	Phototropic-responsive NPH3 family protein	2.221
67	sulfotransferase 2A	2.216
68	Uncharacterized conserved protein (DUF2358)	2.215
69	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	2.211
70	Wound-responsive family protein	2.181
71	hydroxy methylglutaryl CoA reductase 1	2.177
72	wall associated kinase-like 2	2.171
73	phosphate starvation-induced gene 3	2.150
74	S-locus lectin protein kinase family protein	2.143
75	Unknown function	2.116
76	Malectin/receptor-like protein kinase family protein	2.110
77	starch branching enzyme 2.2	2.106
78	germin 3	2.095
79	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 6	2.093
80	Unknown function	2.071
81	myb-like transcription factor family protein	2.041
82	HXXXD-type acyl-transferase family protein	2.037
83	Exostosin family protein	2.018
84	ARF-GAP domain 11	2.017
85	Flavin-containing monooxygenase family protein	2.014
86	S-locus lectin protein kinase family protein	2.000
87	RAN GTPase 3	1.998
88	beta glucosidase 13	1.985
89	HVA22 homologue D	1.982
90	Unknown function	1.960



**Tabla Suplementaria 6. Los 90 genes que mas se subexpresan del análisis de secuenciación masiva para la hoja H3 en estrés de fósforo.**

No.	Descripción	Log
1	calmodulin 5	-6.782
2	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	-6.329
3	chitinase A	-5.434
4	lipoxygenase 1	-4.956
5	Peroxidase superfamily protein	-4.940
6	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	-4.723
7	Unknown function	-4.683
8	MLP-like protein 43	-4.624
9	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	-4.083
10	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein	-4.082
11	brassinosteroid-6-oxidase 2	-4.075
12	response regulator 9	-4.028
13	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein	-3.945
14	RING/U-box superfamily protein	-3.874
15	chitinase A	-3.870
16	basic pathogenesis-related protein 1	-3.867
17	Unknown function	-3.854
18	low-molecular-weight cysteine-rich 68	-3.834
19	B-box type zinc finger family protein	-3.819
20	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein	-3.796
21	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	-3.779
22	lipoxygenase 1	-3.710
23	low-molecular-weight cysteine-rich 68	-3.696
24	lipoxygenase 2	-3.566
25	Malectin/receptor-like protein kinase family protein	-3.524
26	beta galactosidase 1	-3.518
27	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-3.505
28	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	-3.467
29	Unknown function	-3.457
30	Plant basic secretory protein (BSP) family protein	-3.448
31	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	-3.441
32	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	-3.410
33	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	-3.305
34	plantacyanin	-3.301
35	plasma membrane intrinsic protein 1;4	-3.273
36	Unknown function	-3.247
37	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein	-3.161
38	xylem cysteine peptidase 2	-3.130
39	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	-3.104
40	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	-3.066
41	lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme	-3.063
42	Ankyrin repeat family protein	-3.028
43	glycine-rich protein	-2.995
44	gamma-glutamyl hydrolase 1	-2.993
45	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein	-2.989

**Tabla Suplementaria 6 continuación. Los 90 genes que mas se sobreexpresan del análisis de secuenciación masiva para la hoja H3 en estrés de fósforo.**

46	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	-2.970
47	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-2.924
48	cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4	-2.897
49	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	-2.890
50	isocitrate lyase	-2.888
51	myb domain protein 116	-2.882
52	response regulator 9	-2.872
53	Late Embryogenesis Abundant 4-5	-2.863
54	Tyrosine transaminase family protein	-2.849
55	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	-2.841
56	cytochrome P450, family 82, subfamily G, polypeptide 1	-2.804
57	Thioredoxin superfamily protein	-2.767
58	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein	-2.751
59	receptor-like protein kinase 1	-2.749
60	VIRB2-interacting protein 3	-2.746
61	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein	-2.743
62	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	-2.732
63	Peroxidase superfamily protein	-2.709
64	Raffinose synthase family protein	-2.698
65	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	-2.695
66	Tyrosine transaminase family protein	-2.694
67	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	-2.694
68	lipoxygenase 1	-2.683
69	Pectin lyase-like superfamily protein	-2.663
70	Walls Are Thin 1	-2.654
71	B-S glucosidase 44	-2.653
72	nitrate reductase 1	-2.633
73	plantacyanin	-2.591
74	cellulose synthase-like B4	-2.549
75	NAC domain containing protein 83	-2.540
76	Protein kinase superfamily protein with octicosapeptide/Phox/Bem1p domain	-2.529
77	cellulose synthase-like B3	-2.520
78	expansin A8	-2.509
79	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	-2.508
80	Pectin lyase-like superfamily protein	-2.501
81	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	-2.473
82	cellulose synthase-like B4	-2.473
83	expansin A8	-2.466
84	Pectate lyase family protein	-2.456
85	basic chitinase	-2.453
86	PAR1 protein	-2.417
87	cellulose synthase-like B4	-2.413
88	phospholipase C 2	-2.405
89	MATE efflux family protein	-2.392
90	MATE efflux family protein	-2.391

**Figura Suplementaria 10. alineamiento de las secuencias de aminoácidos para las seis pirofosfatasa identificadas en el genoma de frijol. El motivo rico en aspárticos característico de las pirofosfatasa clásicas se muestra en el recuadro rojo**

<i>Phvulv091004174m AtPPa 1/1-213</i>	1	MSTEENG . . . . .	EEVRENRP	TPRLNERIL	SSLSRRS	VAAHPWHD	39		
<i>Phvulv091007560m AtPPa 3/1-211</i>	1	MAEN - - G . . . . .	EEAQENRP	VPRLNERIL	SSLSRRS	VAAHPWHD	37		
<i>Phvulv091008292m AtPPa 1/1-213</i>	1	MAHHEDS . . . . .	SAWNSGL	PHPKLNERIL	SSLSRRS	VAAHPWHD	39		
<i>Phvulv091014870m AtPPa 6/1-288</i>	1	MAATRAI - TIASNSTCTLLSKKPFVGGTALS	SLGNLKF	CRTRRSYTCRAI	YNPQIVVKEEG	QPETLDYRVF - FVDKSGKKVSPWHD	83		
<i>Phvulv091017440m AtPPa 4/1-215</i>	1	MAPP I . . . . .	ETPNKVSAYQHT	PHPLNERIL	SSL	TRRTVAAHPWHD	42		
<i>Phvulv091024033m AtPPa 4/1-224</i>	1	MDTETVASEVP . . . . .	SKETPNNP	VISHPSSH	PLNERI	SSMTRRSVAAHPWHD	50		
<i>Phvulv091004174m AtPPa 1/1-213</i>	40	LEIGPGAPMIFNCVVEISKGSKVKYELDKKT	-GLIKVDRILYSSVVYP	-HNYGFIPRTL	-CEDNDP	IDY/L	106		
<i>Phvulv091007560m AtPPa 3/1-211</i>	38	LEIGPEAPQIFNCVVEITKGSKVKYELDKKT	-GLIKVDRILYSSVVYP	-HNYGFIPRTL	-CEDNDP	MDY/L	104		
<i>Phvulv091008292m AtPPa 1/1-213</i>	40	LEIGPGAPSVFNCVVEIKGSKVKYELDKKS	-GLIKVDRILYSSVVYP	-HNYGFIPRTI	-CEDSDP	MDY/L	106		
<i>Phvulv091014870m AtPPa 6/1-288</i>	84	IPLRSQ - DDIFNFIVEIPKKS	SAKMEVATDEAF	TPIKQDTKKGKLRYP	YNHWN	NYGLLPQTWEDPSFANA	EVDGAFGDNDPVDYV	168	
<i>Phvulv091017440m AtPPa 4/1-215</i>	43	LEIGPEAPKIFNCVVEIKGSKVKYELDKKT	-GLIKVDRILYSSVVYP	-HNYGFIPRTI	-CEDSDP	IDY/L	109		
<i>Phvulv091024033m AtPPa 4/1-224</i>	51	LEIGPGARTIFNCVVEIKGSKVKYELDKKS	-GLIKIDRVLYSSVVYP	-HNYGFIPRTL	-CEDSDP	LDY/L	117		
<i>Phvulv091004174m AtPPa 1/1-213</i>	107	VLMQEPILPGCFLRARAIGLMPMIDQGEKDDKI	IAVCADDPEYKHYTDF	KELP	-PHRLSEIRRF	FEDYKKNENKEVAVNEFLPA	189		
<i>Phvulv091007560m AtPPa 3/1-211</i>	105	VLMQEPVLP	GCFLRARAIGLMPMIDQGEKDDKI	IAVCADDPEYKHF	TDYKELA	-PHRISEIRRF	FEDYKKNENKEVAVNDFLPA	187	
<i>Phvulv091008292m AtPPa 1/1-213</i>	107	VLMQEPVLP	SFLRARAIGLMPMIDQGERDDKI	IAVCADDPEFRHYTDI	KELP	-PHRLAEIRRF	FEYKKNENKKVDMEDFLPA	189	
<i>Phvulv091014870m AtPPa 6/1-288</i>	169	EIGERQRKIGEV	LKVKPLGALAMIDEGELDWKI	VAILSDDPKASLVNDVNDVEKHF	PGTLTAIRDWF	RDYKIPDGKPA	-NKFGLG	252	
<i>Phvulv091017440m AtPPa 4/1-215</i>	110	VIMQEPVLP	GCFLRAKAI	GLMPMIDQGEKDDKI	IAVCADDPEYRHYNDI	KDLP	-PHRLAEIRRF	FEDYKKNENKEVAVNDFLPA	192
<i>Phvulv091024033m AtPPa 4/1-224</i>	118	IIMQEPVLP	GCFLRAKAI	GLMPMIDQGEKDDKI	IAVCADDPEYRHYNDI	KELP	-PHRLAEIRRF	FEDYKKNENKEVAVNDFLPA	200
<i>Phvulv091004174m AtPPa 1/1-213</i>	190	STAVEAIQFSMDLYAEYILHT	LRR				213		
<i>Phvulv091007560m AtPPa 3/1-211</i>	188	SVAVDAIQYSMDLYAEYILHT	LRR				211		
<i>Phvulv091008292m AtPPa 1/1-213</i>	190	EAAVDAIKYSMDLYAAYIVES	LRRH				213		
<i>Phvulv091014870m AtPPa 6/1-288</i>	253	NQAANKKEYALKVITETNESWNKLIKRS	IPAGELSLA				288		
<i>Phvulv091017440m AtPPa 4/1-215</i>	193	SSAYEAVKHSMTLYADYVIVES	LRR				215		
<i>Phvulv091024033m AtPPa 4/1-224</i>	201	TAAFEAVKRSMSLYADYIVES	LRR				224		



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

**Plant Science**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/plantsci](http://www.elsevier.com/locate/plantsci)



## Changes in expression of soluble inorganic pyrophosphatases of *Phaseolus vulgaris* under phosphate starvation

Eric E. Hernández-Domíguez, Lilián G. Valencia-Turcotte, Rogelio Rodríguez-Sotres\*

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Coyoacán c.p. 04510 Mexico, D.F., Mexico*

## Capítulo 2

### Un estudio preliminar de las pirofosfatasas de *Taxodium mucronatum*



## 1 Abstract

Inorganic pyrophosphate (PPi) is produced mainly as a byproduct of anabolism. Therefore the inorganic pyrophosphatase enzymes (PPase; EC 3.6.1.1), responsible for PPi hydrolysis, are essential for the viability of organisms. Different studies on plant PPase have been published, but the functions of these enzymes in the trees are unknown, and, in particular, little is known about the metabolic adaptations of *Taxodium mucronatum* (Ahuehuete). In this preliminary work, the PPase activity of *T. mucronatum* is documented for the first time. The PPase activities were measured in cones and seedlings, and changes in activity of two PPase isoforms were found under flooding conditions.

## 2 Introducción

Las plantas pueden sufrir daños no sólo por la falta de agua sino también por un exceso de esta, ya que bloquea la difusión de O<sub>2</sub> hacia el suelo, impidiendo que las raíces y otros órganos puedan llevar a cabo la respiración. La inmersión de la raíz es perjudicial para la mayoría de las plantas terrestres, ya que dificulta el crecimiento y puede dar lugar a una muerte prematura. Por ello, las inundaciones tienen una influencia severa sobre la productividad de las tierras cultivables, porque la mayoría de los cultivos no están bien adaptados para hacer frente al estrés por inundación (Setter y Waters, 2003). En condiciones aeróbicas, las plantas pueden oxidar 1 mol de hexosa a través de la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa para producir de 30 a 32 mol de ATP. En ausencia de oxígeno la producción de ATP disminuye considerablemente, por que la glucólisis sólo puede producir 2 mol de ATP por mol de hexosa generando en una crisis energética (Huang *et al.*, 2008; Bailey-Serres y Voesenek, 2008). Durante la crisis energética se requiere optimizar la producción de ATP y limitar el consumo de energía, por lo que procesos altamente demandantes de ATP, como la síntesis de DNA, la división celular (Gibbs y Greenway, 2003) y la producción de RNA ribosomal (Fennoy, *et al.*, 1998) se reducen dramáticamente. En *Arabidopsis* y en otras plantas, el estrés por bajo O<sub>2</sub> limita marcadamente la síntesis de proteínas, pero mantiene el inicio de la traducción de un conjunto de mRNAs, muchos de los cuales codifican enzimas implicadas en el metabolismo anaeróbico y la tolerancia al estrés oxidativo (Branco-Price *et al.*, 2005; Gibbs y Greenway, 2003), por lo que bajo condiciones de falta de O<sub>2</sub>, operan mecanismos que secuestran ciertos mRNAs para evitar traducirlos, consiguiendo así un menor gasto de ATP. Como los mRNA se almacenan, la recuperación de la síntesis de proteínas se puede dar a los pocos minutos después de la reoxigenación (Bailey-Serres y Voesenek, 2008).

Algunas plantas aceleran la glucólisis en condiciones de anoxia, en un mecanismo conocido como el “efecto Pasteur”. Este ayuda a aliviar la gran reducción en la energía producida por la fermentación comparado con la fosforilación oxidativa, especialmente en los periodos iniciales de aclimatación a la anoxia (Gibbs y Greenway, 2003). Aún cuando se ha reportado la expresión de genes y actividades enzimáticas relacionadas con las rutas clásicas anaeróbicas del catabolismo de carbohidratos, evidencias recientes de proteómica y genómica indican que los tejidos de las plantas verdaderamente tolerantes a la anoxia, como es el coleoptilo de *Oryza sativa* (arroz), pero no los de las

plantas intolerantes, como es *Arabidopsis thaliana*, inducen pasos no convencionales de la glucólisis. En el arroz bajo anoxia, se inducen las reacciones de la glucólisis dependientes de PPi, lo que conduce a una mejor regulación de la producción y utilización de la energía (Huang *et al.*, 2005; Loreti *et al.*, 2005; Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007). La inducción de enzimas glucolíticas dependientes de PPi, como la fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa dependiente de PPi (PFP) y la piruvato ortofosfato dicinasa (PPDK), en las plantas tolerantes a la anoxia es reminiscente del metabolismo de organismos procariontes anaeróbicos y protistas, que también cuentan con esta inusual ruta glucolítica dependiente de PPi (Mertens, 1993). En las plantas, un cambio en la moneda energética de la glucólisis de ATP por PPi puede ser benéfica pues dirige la escasa energía disponible a procesos como la ruptura de la sacarosa por la sacarosa sintasa (SPS), en lugar de las invertasas y el mantenimiento del gradiente de protones para el transporte de solutos y el pH citosólico mediado por la H<sup>+</sup>-PPasa (Huang *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de toda esta evidencia, se ha observado que las plantas de papa con expresión disminuida de la PFP son capaces de mantener la misma concentración de PPi citoplásmico (Hajirezaei *et al.*, 1993), ya que bajo anoxia, se reduce la producción de ATP, el crecimiento y la síntesis de proteínas y por ende la producción de PPi tiene que reducirse. Si la planta substituye la falta de energía en forma de ATP por energía en forma de PPi, la concentración de PPi del estado estacionario debería bajar. Sin embargo, la concentración de PPi permanece constante aún bajo anoxia (Dancer y Rees, 1989), lo que hace suponer que su utilización realmente no se incrementa, a menos que el PPi esté siendo generado por alguna vía no caracterizada. En este sentido, se ha propuesto que las mitocondrias pueden producir PPi (Mansurova, 1989), pero es poco probable que la mitocondria tenga una participación activa bajo anoxia, ya que su energización depende en gran medida del oxígeno. La producción de PPi por proplastidios no ha sido documentada y sería interesante explorarla pues es la otra posible vía que involucraría el transporte de PPi desde los tejidos aéreos hacia la raíz. Desafortunadamente, esta posibilidad tampoco ha sido estudiada.

*Taxodium mucronatum* (Ahuehuete) es una especie de los bosques de galería o vegetación riparia, considerándose la base de los ecosistemas de agua dulce más diversos, dinámicos y complejos (Naiman, *et al.*, 1993). Este árbol está adaptado para crecer en sitios propensos a inundarse y es un modelo útil para entender las adaptaciones a condiciones de la anoxia. En este trabajo preliminar se evaluó la actividad PPasa en conos de ahuehuetes en cinco etapas de su desarrollo y se observaron los cambios en la actividad de dos isoenzimas de PPasas en plántulas sometidas a estrés por inundación.



### 3 Antecedentes

#### 3.1 Deficiencia de oxígeno en las plantas

Las plantas pueden sufrir daño por una baja o nula difusión de O<sub>2</sub>, impidiendo que las raíces y otros órganos pueden llevar acabo la respiración. Como muchos eucariotes, las plantas son organismos aerobios obligados y dependiendo de las condiciones de oxígeno y según la cantidad de oxígeno presente, el estatus puede ser definido como normoxico, hipoxia o anoxia (Tabla1).

**Tabla 1. Impacto de la privación de oxígeno sobre el metabolismo respiratorio.**

Estatus de Oxígeno	Efecto del metabolismo
Normoxico (aerobico)	La respiración aeróbica procede normalmente. Al menos toda la producción de ATP resulta de la fosforilación oxidativa
Hipoxia	La presión parcial de O <sub>2</sub> limita la producción de ATP por fosforilación oxidativa. La glucólisis contribuye en gran porcentaje del ATP producido. Cambios metabólicos y del desarrollo se estimulan para conseguir una adaptación al ambiente bajo en oxígeno
Anoxia (anaerobico)	El ATP es producido sólo por medio de la glucólisis Las células exhiben bajos contenidos de ATP, disminuye la síntesis de proteínas, se afecta la división y elongación Si las condiciones persisten, muchas células de la planta mueren.

La perdida parcial (hipoxia) o total (anaerobiosis) del oxígeno disponible es un fenómeno biológico universal que ocurre en todos los seres vivos (Kennedy *et al.*, 1992). Muchos organismos, incluyendo microbios, invertebrados y vertebrados experimentan de alguna manera la baja o nula presencia de oxígeno, fenómeno que en las plantas parece ser mas común. Las plantas tienen un absoluto requerimiento por oxígeno para cubrir los procesos de respiración y oxigenación y sin el oxígeno libre muchas plantas de crecimiento activo son incapaces de sobrevivir por periodos largos de tiempo antes de que un daño irreversible ocurra o no pueden desarrollarse suficientemente para reproducirse (Hook y Crawford, 1978). En consecuencia, las plantas están dotadas de características anatómicas y morfológicas, tales que facilitan numerosos estomas, una gran superficie y espacios intercelulares interconectados que facilitan la entrada y distribución de oxígeno atmosférico. Sin embargo, circunstancias ambientales puede restringir la aireación en parte o en toda la planta ( Hook y Crawford, 1978; Jackson *et al.*, 1991). Cuando esto ocurre, la hipoxia o la anoxia inhiben

inevitablemente las rutas dependientes de oxígeno especialmente el sistema de generación de la energía, altera la relación funcional entre las hojas y las raíces, suprimen la asimilación de carbono y la utilización de fotosintatos (Vartapetian y Jackson, 1997). La anoxia frecuentemente se da en condiciones de inundación y afecta las raíces, semillas u otro órgano que se encuentre directamente bajo tierra o que quede sumergido, ya que el exceso de agua provoca la exclusión del oxígeno. Además, la parte aérea puede también sufrir daño de manera indirecta porque el estrés causa la pérdida de las funciones de la raíz.

Se ha observado que el estrés por anaerobiosis causa grandes pérdidas económicas en muchas regiones del mundo y es una razón por la que una gran cantidad de investigadores se ocupen de analizar los procesos fisiológicos, bioquímicos y genéticos que acontecen en las células de las plantas en condiciones de anoxia, dentro de estos procesos se incluyen: (a) la acidificación del citosol, (b) la generación de energía suficiente (ATP) para mantener la integridad celular y (c) muerte por lesiones metabólicas causadas por la reentrada de oxígeno después de un periodo sin éste. Además, están los efectos dañinos que sufre la parte aérea por la imposibilidad de recibir agua, minerales y hormonas provenientes de las raíces. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer o sobrevivir por períodos de tiempo limitados con todos o algunos de sus órganos en un entorno sin oxígeno, habilidad que en raíces preexpuestas a bajas concentraciones de oxígeno se ha observado que aumenta (Andrews y Pomeroy, 1981, 1983; Saglio *et al.*, 1988). En humedales, plantas anfibias y acuáticas también pueden sobrevivir durante meses en suelos inundados; condiciones en las que la mayoría de las especies mueren. Estas observaciones, claramente indican que existen mecanismos que confieren y extienden tolerancia a la anoxia o permiten que tenga lugar la adaptación y aclimatación de las plantas.

Durante condiciones de anaerobiosis se reduce rápidamente la disponibilidad de  $O_2$  como aceptor final en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (CTEmt) provocando en una rápida reducción de la proporción ATP/ADP. Las células hacen frente a esta crisis energética apoyándose principalmente en la glucólisis y en la fermentación para generar ATP y regenerar  $NAD^+$  respectivamente. Cuando la respuesta a bajo  $O_2$  se activa, la célula requiere una estrecha regulación de la producción y el consumo de ATP, para conseguir una acidificación limitada del citosol y lograr un mejor manejo de las especies reactivas de oxígeno después de una reoxigenación (Bailey and Voesenek,

2008). Pocos minutos después de que la célula entra en condiciones de bajos niveles de  $O_2$  se altera el metabolismo anaeróbico para aumentar la generación de ATP por la glucólisis citosólica y se limitan los procesos que requieren un consumo elevado de energía (Drew, 1997). Este cambio es seguido por la fermentación del piruvato para dar etanol o lactato como productos finales, produciendo  $NAD^+$  para sostener el metabolismo anaeróbica (Figura 1). Una crisis en la disponibilidad de ATP se produce porque la glucólisis es ineficiente y solo produce de 2 a 4 mol de ATP por mol de hexosa en comparación con los 30 a 36 mol de ATP producidos por el CTEmt

La respuesta metabólica a la privación de  $O_2$  es orquestada por la disponibilidad y movilización de los carbohidratos (Drew, 1997; van Dongen *et al.*, 2003). En algunas plantas y tejidos se da la inducción de amilasas por bajos niveles de  $O_2$  o inundación y se promueve la conversión de almidón a glucosa (Figura 1). De cualquier modo, la movilización del almidón durante la privación de  $O_2$  no es universal. Los tubérculos de las papas como los rizomas de la planta del pantano (tolerante a la inundación) *Acorus calamus* tienen considerables cantidades de carbohidratos de reserva, pero los rizomas de *Acorus* poseen una mayor capacidad para movilizar el almidón en azúcares bajo anoxia. Un lento consumo del almidón permite a los rizomas de *Acorus* sostener el metabolismo en un nivel bajo logrando que la planta sumergida pueda sobrevivir largos periodos (Arpagaus y Braendle, 2000).

Las plantas poseen dos rutas independientes para el catabolismo de la sacarosa, la ruta bidireccional de la sacarosa sintasa (SUS) y la de la invertasa (INV) que es unidireccional (Figura 1). El costo neto para entrar a la glucólisis es una mol de pirofosfato por mol de sacarosa vía SUS, si el UTP producido por la UDP glucosa pirofosforilasa (UGPPase) es utilizado por la frutocinasa (FK) en la subsecuente conversión de UDP-glucosa a glucosa-6P y el ATP consumido por la FK es reciclado por la nucleótido difosfato cinasa (NDP). Al contrario, el costo por la vía de la INV es dos moles de ATP por mol de sacarosa. La ruta por la vía de la SUS es regulada positivamente por bajos niveles de  $O_2$  por un incremento en SUS y por la represión de la expresión génica y la actividad de la INV (Bologa *et al.*, 2003; Geigenberger, 2003; Geigenberger *et al.* 2000; Koch, 2004; Lasanthi-Kudahetting *et al.*, 2007). La desventaja energética de la vía de la INV se confirmó por la incapacidad de tubérculos de papa transgénicos con una elevada actividad invertasa para mantener los niveles de ATP bajo concentraciones del 8% de  $O_2$  (Bologa *et al.*, 2003). La ruta SUS se estimula en una gran variedad de

especies por un rápido incremento de la transcripción del mRNA para SUS. Otras reacciones glucolíticas pueden utilizar el PPI disponible durante el estrés de O<sub>2</sub> y con ello mejorar la producción neta de ATP por mol de sacarosa catabolizada. La fosforilación de fructosa 6P a fructosa 1,6P2 por la bidireccional PPI-dependiente fosfofructocinasa (PFP) es favorecida sobre la unidireccional ATP-dependiente fosfofructocinasa (PFK) y una piruvato Pi dicinasa (PPDK) puede sustituir a la piruvato cinasa citosólica (PK) en plántulas de arroz desprovistas de O<sub>2</sub> (Plaxton y Podesta, 2006).

Durante un crisis de O<sub>2</sub>, la enzima piruvato descarboxilasa (PDC) convierte el piruvato a acetaldehído, que es metabolizado por la alcohol deshidrogenasa (ADH) para dar etanol, con la regeneración de NAD<sup>+</sup> para sostener la glucólisis. Genotipos deficientes en PDC y ADH confirman la importancia de la fermentación alcohólica en la aclimatación del estrés por bajo O<sub>2</sub> (Drew, 1997; Gibbs y Grenway , 2003; Baxter-burell *et al.*, 2002; Kürsteiner *et al.*, 2003). La producción de etanol es benigna debido a su rápida difusión fuera de la célula, mientras que el acetaldehído es tóxico. La acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) cataliza la conversión de acetaldehído a acetato, con la concomitante reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH. Una ALDH mitocondrial es significativamente inducida por anoxia en el coleoptilo del arroz (Lasanthi-Kudahetting *et al.*, 2007; Nakazono *et al.*, 2000) pero no en plántulas de *Arabidopsis* (Kürsteiner *et al.*, 2003). La actividad ALDH correlaciona con la capacidad de *Echinochloa crusgalli* para germinar bajo estrictas condiciones de anoxia (Fukao *et al.*, 2004). Sin embargo, bajo condiciones limitadas de O<sub>2</sub>, la ALDH consume NAD<sup>+</sup> y puede por lo tanto limitar la glucólisis, mientras que durante una reoxigenación el acetaldehído convertido a acetato entra al ciclo del ácido tricarbóxico (Figura 1).

El nitrato y nitrito también están implicados en el ajuste al déficit de O<sub>2</sub>. El nitrato es asimilado y reducido a amonio vía nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) (Figura 1). El mRNA para NR se incrementa significativamente en respuesta a hipoxia/anoxia pero no el de la NiR en *Arabidopsis* y arroz (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005; Loreti *et al.*, 2005). Raíces de plantas de tabaco modificadas genéticamente con reducidos niveles de NR muestran varias anomalías metabólicas bajo anoxia, incluyendo altos niveles de hexosas soluble y ATP, una elevada producción de etanol y lactato y una elevada acidificación del citosol (Stoimenova *et al.*, 2003). Por el contrario raíces de plántulas de maíz suplementadas con nitrato durante la anoxia mantienen un pH citosólico ligeramente

alto. (Libourel *et al.*, 2006). En particular, el suministro de niveles micromolares de nitrito a las raíces de las plántulas tuvieron un efecto similar en el ajuste del pH citosólico. Este beneficio inesperado de los niveles bajos de nitrito es poco probable que sea debido a un efecto directo en la regeneración de NAD(P)<sup>+</sup> y puede indicar un papel del nitrito en un mecanismo regulador que aumenta la homeostasis en condiciones de baja O<sub>2</sub>.

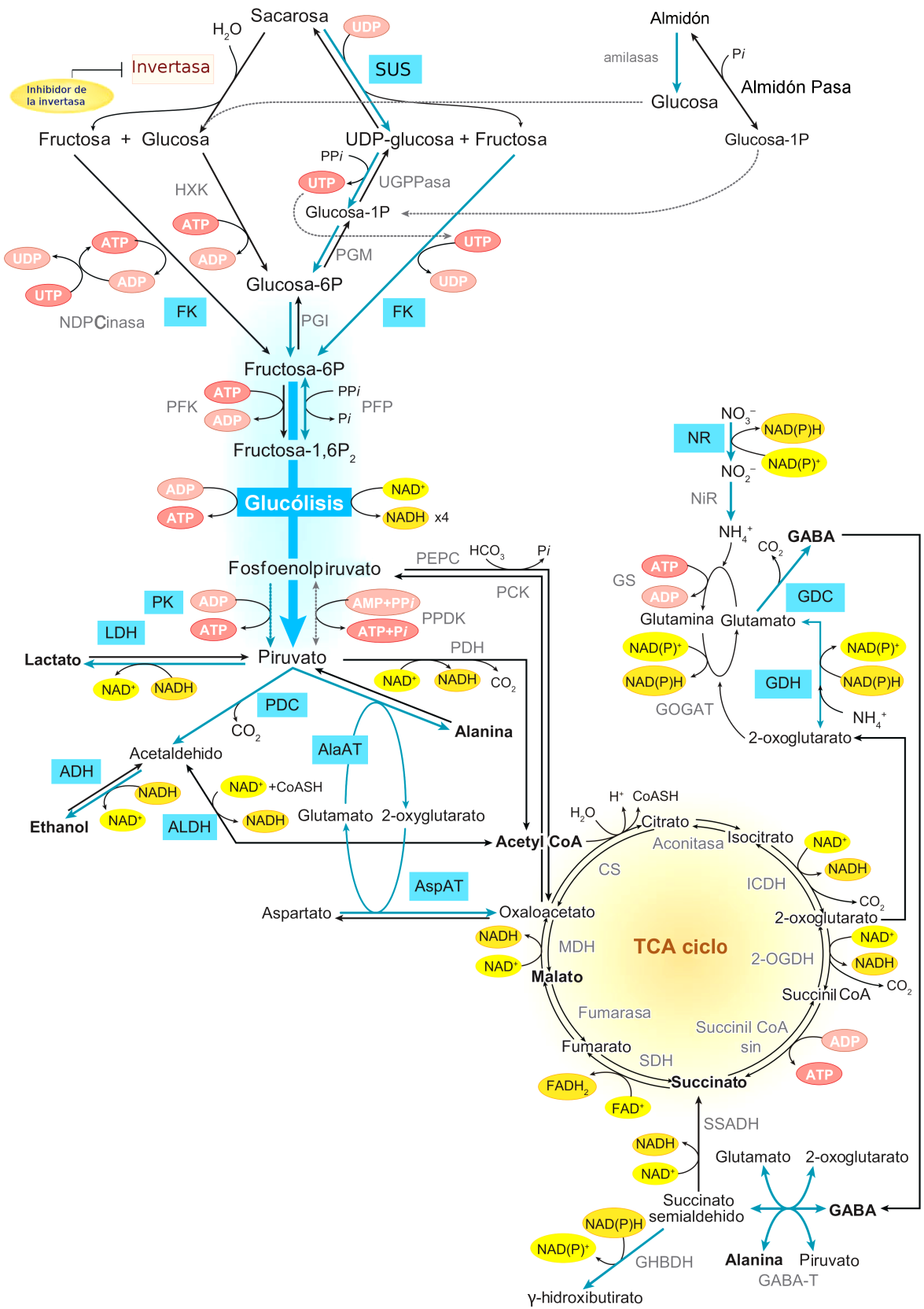


Figura 1.....

**Figura 1. Aclimatación metabólica en condiciones de bajo O<sub>2</sub>. Las plantas tienen muchas rutas para el catabolismo de la sacarosa, la producción de ATP y regeneración de NAD<sup>+</sup> y NAD(P)<sup>+</sup>. Flechas azules reacciones que son promovidas durante el estrés. Los metabolitos indicados en negritas son los productos finales del metabolismo bajo hipoxia. Las abreviaturas son como sigue: 2-OGDH, 2-oxoglutarato deshidrogenasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; AlaAT, alanina aminotransferasa; ALDH, acetaldehído deshidrogenasa; AspAT, aspartato aminotransferasa; CoASH, coenzima A; CS, citrato sintasa; FK, fructocinasa; GABA-T, GABA transaminasa; GDC, glutamato decarboxilasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; GHBDH,  $\gamma$ -aminobutirato deshidrogenasa; GOGAT, NADPH-dependiente glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferasa; GS, glutamina sintasa; HXK, hexocinasa; ICDH, isocitrato deshidrogenasa; LDH, lactato deshidrogenasa; MDH, malato deshidrogenasa; NDP cinase, nucleótido difosfato cinasa; NiR, nitrito reductasa; NR, nitrato reductasa; PCK, fosfoenolpiruvato carboxilasa cinasa; PDC, piruvato descarboxilasa; PDH, piruvato deshidrogenasa; PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; PFK,ATP-dependiente fosfofructocinasa; PFP, PPi-dependinte fosfofructocinasa; PGI, fosfoglucoisomerasa; PGM, fosfoglucomutasa; PK, piruvato cinasa; PPK, piruvato Pi dicinasa; SDH, succinato deshidrogenasa; SSADH, succinato semialdehído deshidrogenasa; Almidón Pasa, almidón fosforilasa; SUS, sacarosa sintasa; UGPPasa, UDP-glucosa pirofosforilasa. Adaptado de Bailey y Voesenek (2008).**

## 4 Hipótesis

La actividad de las pirofosfatasas inorgánicas de *Taxodium mucronatum* cambiará dependiendo del estadio de desarrollo de los conos y como respuesta al someter plántulas a estrés por inundación.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivos generales

- Identificar los cambios en la actividad pirofosfatasa de *Taxodium mucronatum* en conos en desarrollo y en plántulas sometidas a estrés por inundación

### 5.2 Objetivos Particulares

- Observar el efecto de la anoxia sobre la actividad PPasas de *Taxodium mucronatum* (Ahuehete).
- Determinar el cambio en la actividad de las PPasas de los conos de Ahuehetes durante su desarrollo.



## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Taxodium mucronatum* se extrajeron de conos recolectados de árboles localizados en la Ciudad de México. Las semillas se desinfectaron con disolución 3 % de hipoclorito de sodio por 10 minutos y se lavaron con agua desionizada estéril para eliminar el hipoclorito. Las semillas fueron puestas en toallas de papel estériles, humedecidas con agua desionizada y colocadas en frasco de vidrio tapados dentro de una incubadora. La germinación y el crecimiento temprano fueron durante dos semanas a 28°C.

### 6.2 Extracción del tejido y ensayo de actividad pirofosfatasa

Los conos con diferente estado de desarrollo se congelaron por separado usando nitrógeno líquido y se molieron en un mortero con la ayuda de un pistilo en 3-5 mL de buffer Tris-HCl. Los extractos se colocaron en tubos, se centrifugaron 16000 x g por 10 min y la fracción soluble se utilizó para medir la actividad usando electroforesis nativa. Las plántulas de *T. mucronatum* se homogeneizaron usando el equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals™) en 0.1M de buffer Tris-HCl, pH 7.4, con 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de EDTA y 15% (v/v) de glicerol. Los extractos se centrifugaron a 16000 x g por 10 min, a 4 °C y la fracción soluble se utilizó en SDS-PAGE y en la electroforesis nativa.

La electroforesis nativa y SDS-PAGE se realizaron como se describe por (Hernández-Domínguez *et al.*, 2012) y la concentración de proteína se determinó en microplaca utilizando el reactivo *Bradford assay kit* diseñado por Bio-Rad™ a 595 nm en un lector de microplacas Benchmark® (Bio-Rad™), usando albumina de suero bovino como estándar. La actividad pirofosfatasa en gel se estimó por análisis densitométrico y normalizada contra la proteína total determinada en gel SDS-PAGE y revelado con plata

### 6.3 Estrés por inundación

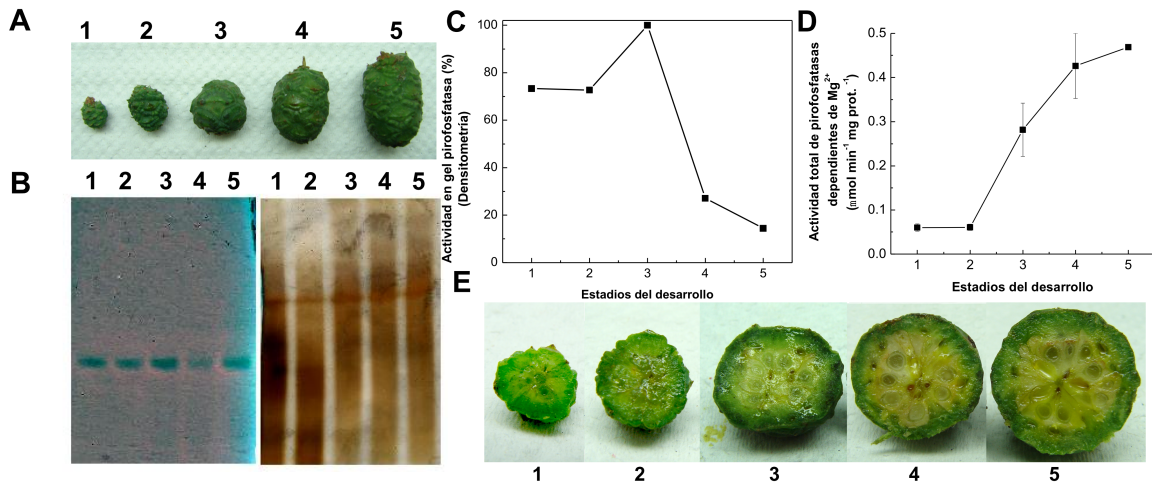
El ensayo de estrés por inundación se realizó con plántulas de dos semanas de crecimiento a 28 °C. Para ello, las plántulas se colocaron en viales y la raíz primaria se inundó con agua estéril. Las plántulas fueron incubadas en estas condiciones por diferentes periodos de tiempo (de 0 a 90 min con intervalos de 10 min) bajo luz natural. Al final de la incubación, la proteína de las plántulas se analizó como se describen el apartado 6.2

## 7 Resultados

### 7.1 Medición de la actividad pirofosfatasa durante el desarrollo de los conos de *Taxodium mucronatum*

El pirofosfato es un producto de los proceso de biosíntesis como puede ser la síntesis de DNA y proteínas. Durante el desarrollo de las tejidos, muchos procesos bioquímicos y moleculares muestran cambios importantes. Nosotros decidimos determinar la actividad PPasa en conos de *Taxodium mucronatum* en cinco diferentes estados del desarrollo. La Figura 2A muestra la forma, el color y el tamaño de los conos intactos y en la Figura 2E se muestra un corte transversal de los conos, observando su morfología interna y pueden apreciarse las estructuras reproductivas (Beley *et al.*, 2000) Al inicio del desarrollo de los conos (estadios 1, 2) los estróbilos presentan una cubierta gruesa, el desarrollo de las semillas no es evidente a simple vista y los tejidos tienen un color verde oscuro. (Figura 2A y 2E). En el estadio 3 la archegonia y los tegumentos se hacen evidentes (Figura 2E) y en las etapas 4 y 5, las semillas, los tegumentos y el megagametofito se distinguen claramente (Figura 2E). En estos últimos estadios del desarrollo el color verde oscuro de los estróbilos es restringido en las capas mas externas. La presencia de PPasas se determinó en zimogramas usando los extractos solubles de los conos de *T. mucronatum* (metodología que permitió la separación de algunas isoformas en *Phaseolus vulgaris*) (Hernández-Domínguez *et al.*, 2012). El gel se dividió en dos partes y una se reveló para actividad PPasa (Figura 2A, izquierda) y la otra por tinción con plata como control de carga (Figura 2B, derecha). En el análisis densitométrico (Figura 2C) se observó un incremento transitorio en la actividad PPasa con un pico en el estadio 3. La actividad mostró una significativa caída hacia el final del desarrollo. Una banda principal de actividad se observó en gel pero también se percibió un ligero

barrido de actividad que se extiende hacia abajo del gel. En la Figura 2D se observa la actividad total PPasa en los extractos crudos. Esta actividad incrementó en paralelo conforme avanzó el desarrollo alcanzando un aumento de 8 veces en el estadio 5 con respecto al estadio inicial.

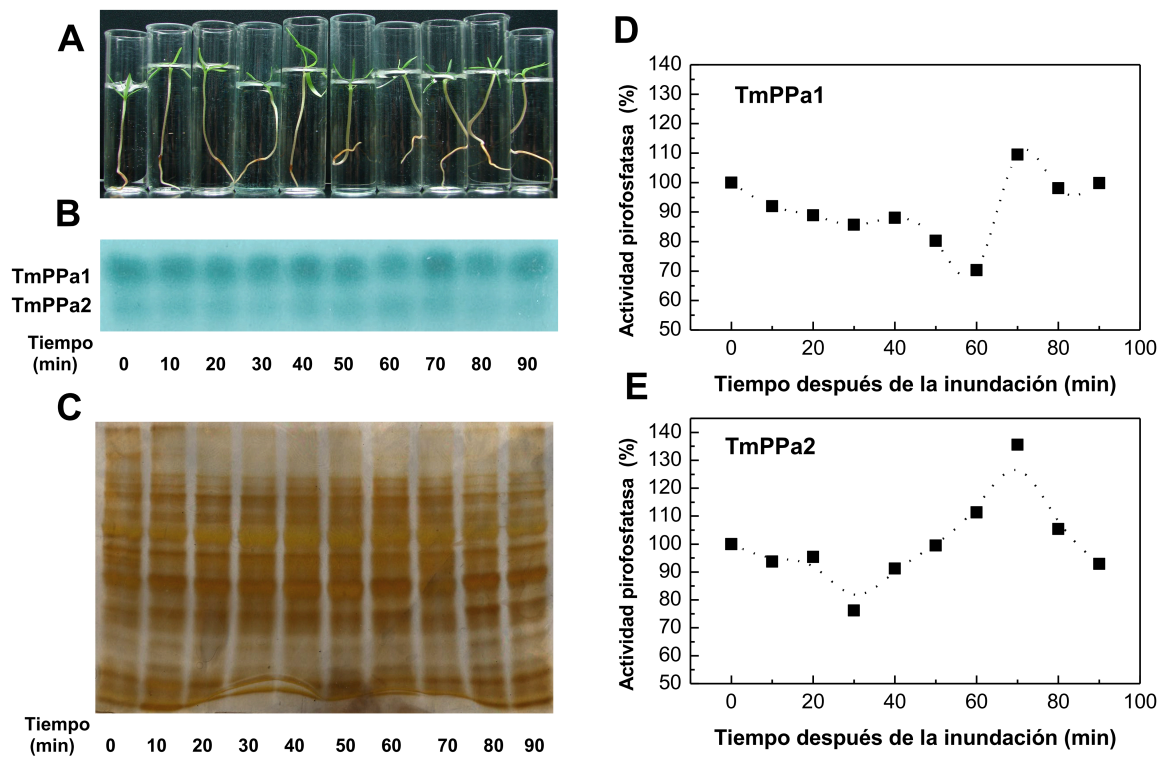


**Figura 2. Medición de la actividad pirofosfatasa en conos de *T. mucronatum* en diferentes estados del desarrollo. A) Morfología de conos en cinco diferentes estados del desarrollo. B) Electroforesis nativa. El gel se cargó con 5 µg de proteína total extraída de los conos, se corrió, se cortó por la mitad y se reveló por actividad con verde de malaquita (panel izquierdo) y con plata (panel derecho). C) Análisis densitométrico de la actividad TmPPa1 el valor más alto de actividad (estado tres) corresponde al 100% de actividad. D) Corte transversal de conos *T. mucronatum* mostrando la formación de las semillas en cinco diferentes etapas del desarrollo.**

## 7.2 Medición de la actividad pirofosfatasa en plántulas de *Taxodium mucronatum* en condiciones de inundación

La anoxia es una condición de estrés frecuente en las plantas y conduce a un déficit de energía que puede provocar un cambio en el uso de ATP por PPi como donador de alta energía (Huang *et al.*, 2008). Esta es una condición a la que es probable que *Taxodium mucronatum* (ciprés Moctezuma) está expuesto y junto con *Taxodium distichum* (falso ciprés de los pantanos) y *Taxodium ascendens* (ciprés de los pantanos), las otras dos especies del género *Taxodium*, son capaces de tolerar y continuar su crecimiento. Por ello, se evaluó el efecto de la inundación sobre la actividad de las PPasas en plántulas *Taxodium mucronatum* con dos semanas de crecimiento. Las condiciones de inundación se replicaron en el laboratorio inundando la raíz de las plántulas en agua estéril hasta por 100 min (Figura 3A). Con intervalos de 10 min se extrajo proteína soluble de las plántulas completas y la actividad PPasas se

determinó en geles de actividad (Figura 3B). En contraste con el zimograma de los conos (Figura 2B) donde se aprecia solo una banda, la Figura 3B muestra dos bandas con diferente intensidad. Las bandas se nombraron como TmPPa1 y TmPPa2 y su intensidad relativa se analizó por densitometría y se normalizó empleando los valores de proteína obtenidos de un gel SDS-PAGE teñido con plata. La intensidad al tiempo cero de TmPPa1 se consideró como el 100% de la actividad (Figura 3D). Como se muestra en las Figuras 3D y 3E los resultados de las densitometrías para estas dos actividades no coinciden, pero ambas presentaron una disminución de actividad en un 10% para TmPPa1 y del 25% para TmPPa2 durante los primeros 30 min. A este tiempo la actividad TmPPa2 incrementó en un 40% a los 70 min con respecto al tiempo a los 30 min, luego regresó casi a la actividad inicial. TmPPa1 por el contrario, después de los 30 min continuó descendiendo hasta los 60 min, donde se observó una caída en la actividad del 30 %, pasado este tiempo la actividad en TmPPa1 registró un repentino incremento de aproximadamente un 50% para finalmente regresar a los valores iniciales (Figura 3D).



**Figura 3.** Cambios en la actividad pirofosfatasa de plántulas *T. mucronatum* bajo condiciones de inundación. **A)** Fotografía de las plántulas de 2 semanas incubadas bajo inundación. **B)** Zimograma de la actividad pirofosfatasa en extractos crudos obtenidos de plántulas completas de *T. mucronatum*. **C)** Gel SDS-PAGE revelado con plata, utilizado como control de carga en el análisis densitométrico. **(D)** Análisis densitométrico de actividad pirofosfatasas TmPPa1 y **(E)** de TmPPa2. La actividad es expresada como porcentaje de la actividad en el tiempo cero.

## 8 Discusión

*Taxodium mucronatum* (Ahuehuete; árbol nacional) es una especie típica de México, aunque también se le encuentra en zonas muy localizadas del sur de Texas y de Guatemala (Sternberg y Wilson, 2004), es un árbol siempre verde con un tamaño que puede alcanzar más de 20 m con una esperanza de vida de 2500 años y al igual que *Taxodium distichum* y *Taxodium ascendens* se localiza junto a ríos y zonas fácilmente inundables. Para nosotros es de gran interés estudiar a *Taxodium mucronatum* en estas condiciones ya que el PPI se ha propuesto como una fuente de energía alterna para la célula durante algunas condiciones de estrés, incluyendo anoxia (Debrota, 2006) y experimentos en el coleoptilo del arroz en donde se observa una disminución en la actividad de las PPasas, (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2007). Sugiere una importante participación del PPI y las PPasas en estas condiciones. Sin embargo, no existen estudios detallados de la fisiología, bioquímica, proteómica y genómica de esta conífera, lo que hace aún más interesante trabajar con este árbol.

Muchos de los eventos involucrados en la formación de las semillas requieren un metabolismo activo (Bewley *et al.*, 2000) con alta producción de PPI, por lo que enzimas que catalizan su hidrólisis podrían ser requeridas. En la Figura 1 se observan los cambios en la actividad de las PPasa a lo largo del desarrollo de los conos y puede reflejar el nivel de la actividad biosintética. Desafortunadamente, los niveles de la actividad metabólica no se ha investigado en los árboles y no es posible correlacionarse con la actividad de las PPasa. La actividad en solución no sigue la misma tendencias como es la actividad en zimogramas. Esto indica que muchas enzimas pueden interferir con la verdadera actividad PPasa. En este sentido, la actividad en el zimograma es más significativa

Recientemente, nosotros reportamos la respuesta de la expresión de los mensajeros para las PPasas de *Phaseolus vulgaris* bajo estrés de fósforo (Hernández-Domínguez *et al.*, 2012) y los resultados de este trabajo sugieren una función específica para las isoformas de las PPasas. Los resultados obtenidos en las plántulas de *Taxodium mucronatum* en condiciones de inundación sugieren que las PPasa del Ahuehuete también tienen funciones específicas. Bajo condiciones de anoxia, la energía de la célula es limitada y el PPI puede servir como una fuente alterna de energía (Huang *et al.*, 2008), esta propuesta sugiere una disminución en la actividad de las PPasas, ya que estas enzimas parecen responder al estrés (Hernández-Domínguez *et al.*, 2012; Hinde *et al.*, 1966) y los experimentos

de anoxia en el coleoptilo del arroz muestran una disminución en la actividad PPasa (Lasanthi-Kudahettige *et al.*, 2012). La recuperación de la actividad de TmPPa1 y TmPPa2 al final del ensayo de inundación (Figura 2) sugiere una respuesta adaptativa, consistente con la habilidad de esta especie a tolerar inundaciones frecuentes, pero también sugiere funciones para las enzimas PPasas durante la transición a un nuevo estado metabólico. Los datos presentados en este trabajo también revelan la existencia de al menos dos isoformas de PPasas en *Taxodium mucronatum*. Además, podrían existir otras isoformas que no se identificaron con los métodos experimentales empleados en este estudio. En este contexto y sabiendo que otros árboles contienen en su genoma más isoformas, tal es el caso del genoma *Populus trichocarpa* (<http://www.phytozome.net/>) revela la existencia de 5 genes (gb accesiones ABK93489.1, ABK93990.1, ABK94595.1, ABK94842.1, ABK95078.1) con una alta similitud a las PPasas de *A. thaliana*.

Definitivamente este es un trabajo inicial en el que por primera vez se aborda el tema de las PPasas en un árbol y en este sentido *Thaxodium mucronatum* puede ser un modelo biológico con alto potencial para el estudio de las PPasas y otras proteínas. De cualquier modo no existen estudios detallados de la fisiología, bioquímica, proteómica y genómica de esta conífera y mucho menos hay estudios en relación a las enzimas pirofosfatasa (PPasa) y las funciones que están realizando en el árbol, por ejemplo durante el desarrollo o la respuesta a un tipo de estrés. Sin embargo, es necesario responder una gran número de interrogantes, como por ejemplo: (1) el número de isoformas presentes en el genoma de *T. mucronatum* y la secuenciación masiva podría ser clave para resolver esta incógnita, (2) la función que desempeñan y como responden las distintas isoformas a una gran variedad de condiciones de estrés abiótico, biótico y/u hormonas, (3) los mecanismos de regulación a niveles de transcripción, y traducción, (4) modificaciones postraduccionales y (5) árboles modificados genéticamente mediante la regeneración de cayos, por mencionar algunas, de cualquier modo para poder realizar todo este trabajo primero hay que generar una gran cantidad de herramientas bioquímicas y moleculares y establecer controles por ejemplo usando especies donde la adaptación a la inundación está comprobada o su hábitat está permanentemente inundado.

## 9 Conclusiones

Los resultados de este trabajo revelan cambios en la actividad PPasas de *Taxodium mucronatum* en dos procesos no relacionados: durante el desarrollo de los conos y en condiciones de inundación en plántulas. Estos cambios sugieren una función importante de las PPasas en los procesos de crecimiento y desarrollo y en respuesta a la inundación. Finalmente en este trabajo se encontraron evidencias de la existencia de dos PPasas. De cualquier modo el metabolismo y la fisiología molecular de esta especie merece más atención en futuros estudios.

## **The inorganic pyrophosphatases of *Taxodium mucronatum* in cone development and flooding stress**

***Eric E. Hernández-Domínguez\* and Rogelio Rodríguez-Sotres.***

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Coyoacán c.p. 04510 D.F. México. Telephone: 52-55-56225285.

\*To whom all correspondence should be sent.

Chief Editor: José J. Zúñiga-Aguilar. Received: June 20, 2012. Revised version: July 24, 2012. Accepted: August 05, 2012

International Biotechnology Color Journal, volume 2, issue 2, June, 2012

© 2011, all rights reserved International Foundation for Biotechnology Research & Early Stimulation in the Culture of Health, Nutrition, Sport, Art, Science, Technology & Society A.C.



## Bibliografía

- Abel, S., Ticconi, C. A., & Delatorre, C. A. (2002). Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 115(1), 1-8.
- Andrews, C., J., Pomeroy, M., K. (1981). The effect of flooding pretreatment on cold hardiness and survival of winter cereals in ice encasement. *Canadian Journal of Plant Sciences* 61 507-513.
- Andrews, C., J. Pomeroy, M., K. (1983). The influence of flooding pretreatment on metabolic changes in winter cereal seedlings during ice encasement. *Canadian Journal of Botany* 61: 42-147.
- Aravind, L., & Koonin, E. V. (1998). A novel family of predicted phosphoesterases includes Drosophila prune protein and bacterial recJ exonuclease. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(1), 17-19.
- Aung, K., Lin, S.-I., Wu, C.-C., Huang, Y.-T., Su, C.-lin, & Chiou, T.-J. (2006). pho2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant physiology*, 141(3), 1000-1011.
- Avaeva, S.M., E.V. Rodina, S.A. Kurilova, T.I. Nazarova, N.N. Vorobyeva 1996. Effect of D42N substitution in Escherichia coli inorganic pyrophosphatase on catalytic activity and Mg<sup>2+</sup> binding. *FEBS Lett.* 392:91-94.
- Avaeva, S. (2000). Active site interactions in oligomeric structures of inorganic pyrophosphatases. *Biochemistry (Moscow)*, 65(3), 361–372.
- Avaeva, S. M., Vorobyeva, N. N., Kurilova, S. a, Nazarova, T. I., Polyakov, K. M., Rodina, E. V., & Samygina, V. R. (2000). Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-induced inhibition of Escherichia coli inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry. Biokhimiia* , 65(3), 373-387.
- Bailey-Serres, J., & Voesenek, L. a C. J. (2008). Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual review of plant biology*, 59, 313-39.
- Baltscheffsky, H. (1997). Major “anastrophes” in the origin and early evolution of biological energy conversion. *Journal of theoretical biology*, 187(4), 495-501
- Baltscheffsky, H., von Stedingk, L.-V., Heldt, H.-W., & Klingenberg, M. (1966). Inorganic Pyrophosphate: Formation in Bacterial Photophosphorylation. *Science*, 153(3740), 1120-1122.
- Baltscheffsky, M., Nadanaciva, S., & Schultz, a. (1998). A pyrophosphate synthase gene: molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the inorganic pyrophosphate synthase from Rhodospirillum rubrum. *Biochimica et biophysica acta*, 1364(3), 301-6.
- Baltscheffsky, M., Schultz, A., & Baltscheffsky, H. (1999). H<sup>+</sup>-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters*, 452(3), 121-127.
- Bao, A.-K., Wang, S.-M., Wu, G.-Q., Xi, J.-J., Zhang, J.-L., & Wang, C.-M. (2009). Overexpression of the Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (Medicago sativa L.). *Plant Science*, 176(2), 232-240.
- Barber, S. A., Walker, J. M., & Vasey, E. H. (1963). Mechanisms for Movement of Plant Nutrients from Soil and Fertilizer to Plant Root. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11(3), 204-207.
- Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M., & Scheible, W. R. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology*, 141(3), 988.
- Bariola, P. A., Howard, C. J., Taylor, C. B., Verburg, M. T., Jaglan, V. D., & Green, P. J. (1994). The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *The Plant Journal*, 6(5), 673-685.
- Bates, T., & Lynch, J. (1996). Stimulation of root hair elongation in Arabidopsis thaliana by low phosphorus availability. *Plant, Cell & Environment*, 19, 529-538.
- Baxter-Burrell, A., Yang, Z., Springer P. S., Bailey-Serres J., (2002). RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat

control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. *Science* 296:2026–28

- Baykov, A. A., Cooperman, B. S., Goldman, A., & Lahti, R. (1999a). Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Progress in molecular and subcellular biology*, 23, 127-50.
- Baykov, A. A., Cooperman, B. S., Goldman, A., & Lahti, R. (1999b). Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Progress in molecular and subcellular biology*, 23, 127-150.
- Baykov, Alexander A., Bakuleva, N. P., & Rea, P. A. (1993). Steady-state kinetics of substrate hydrolysis by vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. A simple three-state model. *European Journal of Biochemistry*, 217(2), 755-762.
- Baykov, Alexander A., Shestakov, A. S. (1992). Two pathways of pyrophosphate hydrolysis and synthesis by yeast inorganic pyrophosphatase. *European Journal of Biochemistry*, 206(2), 463-470.
- Bielecki, R. L. (1973). Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 225-252.
- Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R. B., & Bailey-Serres, J. (2005). Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in Arabidopsis seedlings subjected to oxygen deprivation. *Annals of botany*, 96(4), 647-60.
- Britten, C., Turner, J., & Rea, P. (1989). Identification and purification of substrate-binding subunit of higher plant H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase. *FEBS Letters*, 256(1-2), 200-206.
- Bologa, K., L., Fernie, A. R., Leisse, A., Loureiro, M., E., Geigenberger, P., (2003). A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiology*. 132:2058–72
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55-128.
- Butler, L. G., & Bennett, V. (1969). Phytochrome control of maize leaf inorganic pyrophosphatase and adenylate kinase. *Plant Physiology*, 44(9), 1285-1290. Am Soc Plant Biol.
- Carswell, M. C., Grant, B. R., & Plaxton, W. C. (1997). Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta*, 203(1), 67-74.
- Chen, J., Brevet, a, Fromant, M., Lévêque, F., Schmitter, J. M., Blanquet, S., & Plateau, P. (1990). Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 172(10), 5686-9.
- Chen, Y.-F., Li, L.-Q., Xu, Q., Kong, Y.-H., Wang, H., & Wu, W.-H. (2009). The WRKY6 transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in Arabidopsis. *The Plant cell*, 21(11), 3554-66.
- Chiou, T.-J., & Lin, S.-I. (2011). Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annual review of plant biology*, 62(February), 185-206.
- Cooperman, B. (1982). The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase. *Methods in enzymology*, 287-291. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1978.tb02580.x/abstract>
- Cooperman, B. S. (1982). The mechanism of action of yeast inorganic pyrophosphatase. *Methods in Enzymology*, 87, 526-548.
- Cooperman, B. S., Baykov, A. A., & Lahti, R. (1992). Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(7), 262-266.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., & Scheible, W.-R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(1), 5-17.
- Dancer, J. E., & Rees, T. ap. (1989). Effects of 2,4-dinitrophenol and anoxia on the inorganic-pyrophosphate content of the spadix of *Arum maculatum* and the root apices of *Pisum sativum*. *Planta*, 178(3), 421-424.
- 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.

- Daram, P., Brunner, S., Persson, B. L., Amrhein, N., & Bucher, M. (1998). Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta*, 206(2), 225-233.
- Davies, J. M., Poole, R. J., & Sanders, D. (1993). The computed free energy change of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance. for inorganic-pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1141(1), 29-36.
- Devaiah, B. N., Karthikeyan, A. S., & Raghothama, K. G. (2007). WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 143(4), 1789-801.
- Di Tommaso P., Moretti S., Xenarios I., Orobítg M., Montanyola A., Chang J. M., Taly J. F., Notredame C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39, 13-17.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature reviews. Microbiology*, 3(3), 251-61.
- Drew, M., C. (1997). Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:223–50
- Drozdowicz, Y M, Lu, Y. P., Patel, V., Fitz-Gibbon, S., Miller, J. H., & Rea, P. a. (1999). A thermostable vacuolar-type membrane pyrophosphatase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum*: implications for the origins of pyrophosphate-energized pumps. *FEBS letters*, 460(3), 505-12.
- Drozdowicz, Yolanda M, & Rea, P. A. (2001a). Vacuolar H<sup>+</sup> pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends in Plant Science*, 6(5), 206-211.
- Drozdowicz, Yolanda M, & Rea, P. A. (2001b). Vacuolar H<sup>+</sup> pyrophosphatases. *Trends in Plant Science*, 6(5), 206-211.
- Drozdowicz, Yolanda M, & Rea, P. A. (2001c). Vacuolar H<sup>+</sup> pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends in Plant Science*, 6(5), 206-211.
- Duff, S. M. G., Moorhead, G. B. G., Lefebvre, D. D., & Plaxton, W. C. (1989a). Phosphate Starvation Inducible 'Bypasses' of Adenylate and Phosphate Dependent Glycolytic Enzymes in Brassica nigra Suspension Cells. *Plant Physiology*, 90(4), 1275-1278.
- Duff, S. M. G., Moorhead, G. B. G., Lefebvre, D. D., & Plaxton, W. C. (1989b). Phosphate Starvation Inducible 'Bypasses' of Adenylate and Phosphate Dependent Glycolytic Enzymes in Brassica nigra Suspension Cells. *Plant physiology*, 90(4), 1275-1278.
- Echan, L. A., & Speicher, D. W. (2002). Protein detection in gels using fixation. *Current protocols in protein science editorial board John E Coligan et al, Chapter 10*(Chapter 16), Unit 10.5.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., et al. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of Phaseolus spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature protocols*, 2(7), 1819-24.
- 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(3), 268-72.
- Farré, Eva M, Tech, S., Trethewey, R. N., Fernie, A. R., & Willmitzer, L. (2006). Subcellular pyrophosphate metabolism in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant molecular biology*, 62(1-2), 165-79.
- Felix, R., & Fleisch, H. (1975). Properties of inorganic pyrophosphatase of pig scapula cartilage. *The Biochemical journal*, 147(1), 111-8.
- Fennoy, S. L., Nong, T., & Bailey-Serres, J. (1998). Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *The Plant Journal*, 15(6), 727-735.
- Finkler, A., Ashery-Padan, R., & Fromm, H. (2007). CAMTAs: calmodulin-binding transcription activators from plants to human. *FEBS letters*, 581(21), 3893-8.
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., et al. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics*, 39(8),

- Fujii, H., Chiou, T.-J., Lin, S.-I., Aung, K., & Zhu, J.-K. (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Current biology: CB*, *15*(22), 2038-43.
- Fukao, T., Kennedy, R.A., Yamasue, Y., Rumpho, M. E., (2003). Genetic and biochemical analysis of anaerobically-induced enzymes during seed germination of *Echinochloa crusgalli* varieties tolerant and intolerant of anoxia. *Journal Experimental. Botany*. *54*:1421–29
- Gallagher, S. R. (2001). One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions. *Current protocols in cell biology editorial board Juan S Bonifacino et al, Chapter 6*, Unit 6.5. Wiley Online Library.
- Gao, F., Gao, Q., Duan, X., Yue, G., Yang, A., & Zhang, J. (2006). Cloning of an H<sup>+</sup>-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *Journal of experimental botany*, *57*(12), 3259-3270.
- 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), 840-5.
- Gaxiola, R a, Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., & Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(20), 11444-1449.
- Gaxiola, Roberto a, Sanchez, C. a, Paez-Valencia, J., Ayre, B. G., & Elser, J. J. (2012). Genetic Manipulation of a “Vacuolar” H<sup>+</sup>-PPase: From Salt Tolerance to Yield Enhancement Under Phosphorus-Deficient Soils. *Plant physiology*, *159*(May), 3-11.
- Geigenberger, P., Hajirezaei, M., Geiger, M., Deiting, U., Sonnewald, U., & Stitt, M. (1998). Overexpression of pyrophosphatase leads to increased sucrose degradation and starch synthesis, increased activities of enzymes for sucrose-starch interconversions, and increased levels of nucleotides in growing potato tubers. *Planta*, *205*(3), 428-437.
- Geigenberger, P. (2003). Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr. Opin. Plant Biol.* *6* 247–56.
- Geigenberger, P., Fernie, A. R., Gibon, Y., Christ, M., Stitt, M. (2000). Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biol. Chem.* *381*:723–40
- George, G. M., van der Merwe, M. J., Nunes-Nesi, A., Bauer, R., Fernie, A. R., Kossmann, J., & Lloyd, J. R. (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.
- Gerhardt, R., & Heldt, H. W. (1984). Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. *Plant Physiology*, *14*, 542-547.
- Gibbs, J., & Greenway, H. (2003). Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology*, *30*(3), 353.
- Gonzalez, N., De Bodt, S., Sulpice, R., Jikumaru, Y., Chae, E., Dhondt, S., Van Daele, T., *et al.* (2010). Increased leaf size: different means to an end. *Plant physiology*, *153*(3), 1261-79.
- Gordon-Weeks, R., & Steele, S. (1996). The role of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates and activators of the vacuolar H<sup>+</sup>-pumping inorganic pyrophosphatase (studies using. *Plant physiology*, *111*, 195-202.
- Gómez-García, M. R., Losada, M., & Serrano, A. (2006). A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. *The Biochemical journal*, *395*(1), 211-21.
- Gómez-García, M. R., Losada, M., & Serrano, A. (2007). Comparative biochemical and functional studies of family I soluble inorganic pyrophosphatases from photosynthetic bacteria. *The FEBS journal*, *274*(15), 3948-59.
- Gómez-García, M. R., Ruiz-Pérez, L. M., González-Pacanowska, D., & Serrano, A. (2004). A novel calcium-dependent soluble inorganic pyrophosphatase from the trypanosomatid *Leishmania major*. *FEBS letters*, *560*(1-3), 158-66.

- 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(1).
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95-98.
- Harutyunyan, E. H., Kuranova, I. P., Vainshtein, B. K., Hohne, W. E., Lamzin, V. S., Dauter, Z., Teplyakov, A. V., *et al.* (1996). X-Ray Structure of Yeast Inorganic Pyrophosphatase Complexed with Manganese and Phosphate. *European Journal of Biochemistry*, 239(1), 220-228.
- Hatch, M. D., & Slack, C. R. (1968). A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *The Biochemical Journal*, 106(1), 141-6.
- Heikinheimo, P, Tuominen, V., Ahonen, A. K., Teplyakov, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A., Lahti, R., *et al.* (2001). Toward a quantum-mechanical description of metal-assisted phosphoryl transfer in pyrophosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3121-6.
- Heikinheimo, Pirkko, Lehtonen, J., Baykov, A., Lahti, R., Cooperman, B. S., & Goldman, A. (1996). The structural basis for pyrophosphatase catalysis. *Structure*, 4(12), 1491-1508.
- Heikinheimo, P., Pohjanjoki, P., Helminen, A., Tasanen, M., Cooperman, B.S., Goldman, A., Baykov, A., Laht, R. (1996). A Site-Directed Mutagenesis Study of *Saccharomyces cerevisiae* Pyrophosphatase. *European Journal of Biochemistry* 239(1), 138–143.
- Heinonen, J. K. (2001). *Biological Role of Inorganic Pyrophosphate* (p. 264). Kluwer Academic Publishers.
- Hernández-Domínguez 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
- Hernández, G., Ramírez, M., Valdés-López, O., Tesfaye, M., Graham, M. a, Czechowski, T., Schlereth, A., *et al.* (2007). Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant physiology*, 144(2), 752-67.
- Hernández, G., Valdés-López, O., Ramírez, M., Goffard, N., Weiller, G., Aparicio-Fabre, R., Fuentes, S. I., *et al.* (2009). Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus-stressed common bean plants. *Plant physiology*, 151(3), 1221-38.
- Hinde, R. W., & Finch, L. R. (1966). The activities of phosphatases, pyrophosphatases and adenosine triphosphatases from normal and boron deficient bean roots. *Phytochemistry*, 5, 619-623.
- Holford, I. C. R. (1997). Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research*, 35(2), 227-239.
- Hook D. D., Crawford R. M. M., (1978) *Plant Life in Anaerobic Environments*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI
- Hsieh, L.C., Lin, S.I., Shih, A. C.C., Chen, J.W., Lin, W.Y., Tseng, C.,Y., Li, W.H., *et al.* (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant physiology*, 151(4), 2120-32.
- Hsieh, H.,L., Okamoto, H., Wang, M., Ang L,H., Matsui, M., Goodman, H., Deng, X.,W. (2000) FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes Dev* 14 1958-970
- Huang, H., Patskovsky, Y., Toro, R., Farelli, J. D., Pandya, C., Almo, S. C., Allen, K. N., *et al.* (2011). Divergence of structure and function in the haloacid dehalogenase enzyme superfamily: Bacteroides thetaiotaomicron BT2127 is an inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry*, 50(41), 8937-49.
- Huang, S., Colmer, T. D., & Millar, A. H. (2008). Does anoxia tolerance involve altering the energy currency towards PPI? *Trends in plant science*, 13(5), 221-7.
- Huang, S., Greenway, H., Colmer, T. D., & Millar, a H. (2005). Protein synthesis by rice coleoptiles during prolonged anoxia: implications for glycolysis, growth and energy utilization. *Annals of botany*, 96(4), 703-15.

- Jackson M. B., Davies D. D., Lambers H. (1991) *Plant Life under Oxygen Deprivation: Ecology, Physiology and Biochemistry*. SPB Ac Pub, The Hague, The Netherlands
- Jain, A., Poling, M. D., Karthikeyan, A. S., Blakeslee, J. J., Peer, W. a, Titapiwatanakun, B., Murphy, A. S., *et al.* (2007). Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in Arabidopsis. *Plant physiology*, 144(1), 232-47.
- Jelitto, T., Sonnewald, U., Willmitzer, L., Hajirezeai, M., & Stitt, M. (1992). Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing E. coli pyrophosphatase in their cytosol. *Planta*, 188(2), 238-244.
- Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N. P., & Fu, X. (2007). Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in Arabidopsis. *Plant physiology*, 145(4), 1460-70.
- Johnson, J. F., Allan, D. L., & Vance, C. P. (1994). Phosphorus Stress-Induced Proteoid Roots Show Altered Metabolism in *Lupinus albus*. *Plant physiology*, 104(2), 657-665.
- Johnson, J., Vance, C., & Allan, D. (1996). Phosphorus deficiency in *Lupinus albus* (altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase). *Plant Physiology*, (22243), 31-41.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual review of plant biology*, 57, 19-53.
- Juszczuk, I. (2001). Oxidative stress during phosphate deficiency in roots of bean plants ( *L.*). *Journal of Plant Physiology*, 158(10), 1299-1305.
- Jämsen, J., Tuominen, H., Baykov, A. a, & Lahti, R. (2011). Mutational analysis of residues in the regulatory CBS domains of *Moorella thermoacetica* pyrophosphatase corresponding to disease-related residues of human proteins. *The Biochemical journal*, 433(3), 497-504.
- Kennedy, R. A., Rumpho, M. E., Theodore F. C., (1992) *Anaerobic Metabolism in Plants*. *Plant Physiology* 100, 1-6
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 235–46
- Kolakowski, L. F., Schloesser, M., & Cooperman, B. S. (1988). Cloning, molecular characterization and chromosome localization of the inorganic pyrophosphatase ( PPA ) gene from *S.cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10441-10452.
- Kondracka, A., & Rychter, A. M. (1997). The role of P i recycling processes during photosynthesis in phosphate-deficient bean plants. *Journal of Experimental Botany*, 48(7), 1461-1468.
- Kornberg, A. (1948). The participation of inorganic pyrophosphate in the reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide. *Journal of Biological Chemistry*, 665, 1475-1476.
- Kornberg, A. (1957). Pyrophosphorylases and phosphorylases in biosynthetic reactions. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, 18, 191-240.
- Kornberg, A. (1962). "On the metabolic significance of phosphorylic and pyrophosphorylic reactions" In *Horizons in Biochemistry*. (B. Kasha, M., Pullman, Ed.) (Academic P., pp. 251-64). New York.
- Kowalczyk, S., & Masłowski, P. (1984). Oxidation-linked formation of inorganic pyrophosphate in maize shoot mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 766(3), 570-575.
- Kuo, H.-F., & Chiou, T.-J. (2011). The Role of MicroRNAs in Phosphorus Deficiency Signaling. *Plant physiology*, 156(3), 1016-24.
- Kürsteiner, O., Dupuis, I., Kuhlemeier, C. (2003). The pyruvate decarboxylase1 gene of Arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiology*. 132:968–78

- Lahti, R., Pitkäranta, T., Valve, E., Ilta, I., Kukko-Kalske, E., & Heinonen, J. (1988). Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, *170*(12), 5901-7.
- Lahti, Reijo, Kolakowski, L. F., Heinonen, J., Vihinen, M., Pohjanoksa, K., & Cooperman, B. S. (1990a). Conservation of functional residues between yeast and *E. coli* inorganic pyrophosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1038*(3), 338-345.
- Lahti, Reijo, Kolakowski, L. F., Heinonen, J., Vihinen, M., Pohjanoksa, K., & Cooperman, B. S. (1990b). Conservation of functional residues between yeast and *E. coli* inorganic pyrophosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1038*(3), 338-345.
- Lasanthi-Kudahettige, R., Magneschi, L., Loreti, E., Gonzali, S., Licausi, F., Novi, G., Beretta, O., *et al.* (2007). Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. *Plant physiology*, *144*(1), 218-31.
- Lee, H. S., Cho, Y., Kim, Y.-J., Lho, T.-O., Cha, S.-S., Lee, J.-H., & Kang, S. G. (2009). A novel inorganic pyrophosphatase in *Thermococcus onnurineus* NA1. *FEMS microbiology letters*, *300*(1), 68-74.
- Lee, J.-W., Lee, D.-S., Bhoo, S. H., Jeon, J.-S., Lee, Y.-H., & Hahn, T.-R. (2005). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing *Escherichia coli* pyrophosphatase display both altered carbon partitioning in their source leaves and reduced photosynthetic activity. *Plant cell reports*, *24*(6), 374-82.
- Leigh, R., Pope, A., Jennings, I., & Sanders, D. (1992). Kinetics of the Vacuolar H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase: The Roles of Magnesium, Pyrophosphate, and their Complexes as Substrates, Activators, and Inhibitors. *Plant physiology*, *100*, 1698-1705.
- Lerchl, J., Geigenberger, P., Stitt, M., & Sonnewald, U. (1995). Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *The Plant cell*, *7*(3), 259-70.
- Li, B., Wei, A., Song, C., Li, N., & Zhang, J. (2008). Heterologous expression of the TsVP gene improves the drought resistance of maize. *Plant biotechnology journal*, *6*(2), 146-59.
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *25*(14), 1754-60.
- Li, J., Yang, H., Peer, W. A., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Titapiwantakun, B., *et al.* (2005). *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science (New York, N.Y.)*, *310*(5745), 121-5.
- Li, Z., Baldwin, C. M., Hu, Q., Liu, H., & Luo, H. (2010). Heterologous expression of *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.). *Plant, cell & environment*, *33*(2), 272-89.
- Liang, C., Tian, J., Lam, H.-M., Lim, B. L., Yan, X., & Liao, H. (2010). Biochemical and molecular characterization of PvPAP3, a novel purple acid phosphatase isolated from common bean enhancing extracellular ATP utilization. *Plant physiology*, *152*(2), 854-65.
- Libourel I.G., van Bodegom P.M., Fricker M.D., Ratcliffe R.G. (2006). Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. *Plant Physiology*. 142 1710–17
- Lin, S.-I., Chiang, S.-F., Lin, W.-Y., Chen, J.-W., Tseng, C.-Y., Wu, P.-C., & Chiou, T.-J. (2008). Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant physiology*, *147*(2), 732-46.
- Lin, S.-M., Tsai, J.-Y., Hsiao, C.-D., Huang, Y.-T., Chiu, C.-L., Liu, M.-H., Tung, J.-Y., *et al.* (2012). Crystal structure of a membrane-embedded H<sup>(+)</sup>-translocating pyrophosphatase. *Nature*. 484(7394):399-403
- Lin, W.-Y., Lin, S.-I., & Chiou, T.-J. (2009). Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants. *Journal of experimental botany*, *60*(5), 1427-38.
- Linkohr, B. I., Williamson, L. C., Fitter, A. H., & Leyser, H. M. O. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *29*(6), 751-60.
- Lipmann, F. (n.d.). *Projecting backward from the present stage of evolution of biosynthesis. In the origins of*

- prebiological systems and of their molecular matrices*. (S. W. Fox, Ed.) (Academic P., pp. 259-280). Proc Conf Wakulla Springs, Florida: New York.
- Lipton, D. S., Blanchar, R. W., & Blevins, D. G. (1987). Citrate, Malate, and Succinate Concentration in Exudates from P-Sufficient and P-Stressed *Medicago sativa* L. Seedlings. *PLANT PHYSIOLOGY*, 85(2), 315-317.
- Liu, B., Bartlam, M., Gao, R., Zhou, W., Pang, H., Liu, Y., Feng, Y., *et al.* (2004). Crystal structure of the hyperthermophilic inorganic pyrophosphatase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Biophys. J.*, 86, 420-427.
- Liu, C., Muchhal, U. S., & Raghothama, K. G. (1997). Differential expression of TPS11, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Molecular Biology*, 33(5), 867-874.
- Liu, F., Vantoai, T., Moy, L., Bock, G., Linford, L.D., Quackenbush, J. 2005. Global transcription profiling reveals novel insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 137:1115–29.
- Loreti, E., Poggi, A., Novi, G., Alpi, A., & Perata, P. (2005). A Genome-Wide Analysis of the Effects of Sucrose on Gene Expression in *Arabidopsis* Seedlings under Anoxia 137, 1130-1138.
- Lundin, M., Baltscheffsky, H., & Hans, R. (1991). Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12168.
- Lv, S., Zhang, K., Gao, Q., Lian, L., Song, Y., & Zhang, J. (2008). Overexpression of an H<sup>+</sup>-PPase gene from *Thellungiella halophila* in cotton enhances salt tolerance and improves growth and photosynthetic performance. *Plant & cell physiology*, 49(8), 1150-64.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 280-287.
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M. F., Simpson, J., & Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology*, 129(1), 244-256.
- López-Marqués, R. L., Pérez-Castifeira, J. R., Losada, M., & Serrano, A. (2004). Differential regulation of soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* provides insights into pyrophosphate-based stress bioenergetics. *Journal of bacteriology*, 186(16), 5418-26.
- Madhuvanthi Ramaiah, Ajay Jain, James C. Baldwin, Athikkattuvalasu S. Karthikeyan, and Kashchandra G. Raghothama (2011) Characterization of the Phosphate Starvation-Induced Glycerol-3-phosphate permease Gene Family. *Plant Physiology*, 157, 279–291
- Maeshima, M. (1991). H<sup>(+)</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. Inhibition by Ca<sup>2+</sup>, stabilization by Mg<sup>2+</sup> and immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases. *FEBS*, 196(1), 11-7.
- Maeshima, M., & Yoshida, S. (1989). Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *The Journal of biological chemistry*, 264(33), 20068-73.
- Maeshima, Masayoshi. (2000). Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465, 37-51.
- Maeshima, Masayoshi. (2001). Tonoplast Trnsporers: Organization and Function. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 52, 469-497.
- Maeshima, M., Hara-Nishimura, I., Takeuchi, Y., & Nishimura, M. (1994). Accumulation of Vacuolar H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase and H<sup>+</sup>-ATPase during Reformation of the Central Vacuole in Germinating Pumpkin Seeds. *Plant physiology*, 106(1), 61-69.
- Mansurova, S. E. (1989). Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 977(3), 237-247.
- Marschner, P. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants* .Academic P., p. 920.



- Martín, A. C., del Pozo, J. C., Iglesias, J., Rubio, V., Solano, R., de La Peña, A., Leyva, A., *et al.* (2000). Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in Arabidopsis. *The Plant journal*: for cell and molecular biology, 24(5), 559-67.
- May, A., Berger, S., Hertel, T., & Köck, M. (2011). The Arabidopsis thaliana phosphate starvation responsive gene AtPPsPase1 encodes a novel type of inorganic pyrophosphatase. *Biochimica et biophysica acta*, 1810(2), 178-85.
- Mertens, E. (1993). ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitology Today*, 9(4), 122-126.
- Mimura, T. (1999). *Regulation of Phosphate Transport and Homeostasis in Plant Cells* (Vol. 191, pp. 149-200). Academic Press.
- Misson, J., Raghothama, K. G., Jain, A., Jouhet, J., & A. (2005). genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 11934-11939.
- Mitchell, S. J., & Minnick, M. F. (1997). Cloning, functional expression, and complementation analysis of an inorganic pyrophosphatase from Bartonella bacilliformis. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(8), 734-743.
- Muchhal, U. S., Pardo, J. M., & Raghothama, K. G. (1996). Phosphate transporters from the higher plant Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the*, 93, 10519-10523.
- Naiman, R. J., Decamps, H., & Pollock, M. (1993). The Role of Riparian Corridors in Maintaining Regional Biodiversity. *Ecological Applications*, 3(2), 209.
- Nakanishi, Y., Saijo, T., Wada, Y., & Maeshima, M. (2001). Mutagenic analysis of functional residues in putative substrate-binding site and acidic domains of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *The Journal of biological chemistry*, 276(10), 7654-60.
- Nakazawa M, Yabe N, Ichikawa T, Yamamoto YY, Yoshizumi T, Hasunuma K, Matsui M (2001) DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant Journal* 25:213 – 221
- Nakazono, M., Tsuji, H., Li, Y., Saisho, D., Arimura, S., Tsutsumi, N., Hirai, A. (2000). Expression of a gene encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rice increases under submerged conditions. *Plant Physiology*. 124:587–98
- Navarro de la Sancha, E., Coello-Coutino, M., Valencia-Turcotte, L., Hernandez-Dominguez, E., Trejo-Yepes, G., & Rodriguez-Sotres, R. (2007). Characterization of two soluble inorganic pyrophosphatases from Arabidopsis thaliana. *Plant Science*, 172(4), 796-807.
- Nilsson, L., Müller, R., & Nielsen, T. H. (2007). Increased expression of the MYB-related transcription factor, PHR1, leads to enhanced phosphate uptake in Arabidopsis thaliana. *Plant cell environment*, 30(12), 1499-1512.
- Oksanen, E., Ahonen, A. K., Tuominen, H., Tuominen, V., Lahti, R., Goldman, A., & Heikinheimo, P. (2007). A complete structural description of the catalytic cycle of yeast pyrophosphatase. *Biochemistry*, 46(5), 1228–1239.
- Paez-Valencia, J., Patron-Soberano, A., Rodriguez-Leviz, A., Sanchez-Lares, J., Sanchez-Gomez, C., Valencia-Mayoral, P., Diaz-Rosas, G., *et al.* (2011). Plasma membrane localization of the type I H<sup>(+)</sup>-PPase AVP1 in sieve element-companion cell complexes from Arabidopsis thaliana. *Plant science*, 181(1), 23-30. d
- Pant, B. D., Buhtz, A., Kehr, J., & Scheible, W.-R. (2008). MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *The Plant journal*, 53(5), 731-8.
- Pappenhagen., G. D. P. and J. M. (1978). *Sulphur In: Colormetric Determination of Non-metals*. (M. Elving, P. J., Winefordner, J. P., Kohhoff, I, Ed.) (Chemical a., pp. 463-527). New York: John Wiley & Sons.
- Parfenyev, A. N., Salminen, A., & Halonen, P. (2001). Quaternary structure and metal ion requirement of family II pyrophosphatases from Bacillus subtilis, Streptococcus gordonii, and Streptococcus mutans. *Journal of Biological*, 276(27), 24511.

- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., *et al.* (2011). Expression of an Arabidopsis vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant biotechnology journal*, 9(1), 88-99.
- Perez-Castineira, J. R., Lopez-Marques, R. L., Villalba, J. M., Losada, M., & Serrano, A. (2002). Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 15914-9.
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, 1, 87-112. IUL La Jolla CA.
- Poirier, Y., & Bucher, M. (2002). *Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis*. In *CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD Poirier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J 97, 1087-1093).
- Pérez-Castiñeira, J R, Gómez-García, R., López-Marqués, R. L., Losada, M., & Serrano, A. (2001). Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones? *International microbiology*, 4(3), 135-42.
- Pérez-Castiñeira, José R., López-Marqués, R. L., Losada, M., & Serrano, A. (2001). A thermostable K<sup>+</sup>-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS Letters*, 496(1), 6-11.
- Rabinowitz, J., Flores, J., Krebsbach, R., & Rogers, G. (1969). Peptide Formation in the Presence of Linear or Cyclic Polyphosphates. *Nature*, 224(5221), 795-796.
- Raghothama, K. (1999). Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 665–693. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139,
- Raghothama, K. (2000). Phosphate transport and signaling. *Current opinion in plant biology*.
- Raghothama, K. G., & Karthikeyan, A. S. (2005). Phosphate Acquisition. *Plant and Soil*, 274(1-2), 37-49.
- Rantanen, M. K., Lehtiö, L., Rajagopal, L., Rubens, C. E., & Goldman, A. (2007). Structure of the Streptococcus agalactiae family II inorganic pyrophosphatase at 2.80 Å resolution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 63(Pt 6), 738-43.
- Rea, P A, & Poole, R. J. (1993). Vacuolar H<sup>+</sup>-Translocating Pyrophosphatase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 157-180. doi:10.1146/annurev.pp.44.060193.001105
- Rea, P. A., & Poole, R. J. (1986). Chromatographic Resolution of H<sup>+</sup>-Translocating Pyrophosphatase from H<sup>+</sup>-Translocating ATPase of Higher Plant Tonoplast. *Plant Physiology*, 81(1), 126-129.
- Rea, P. a, Kim, Y., Sarafian, V., Poole, R. J., Davies, J. M., & Sanders, D. (1992). Vacuolar H(+)-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends in biochemical sciences*, 17(9), 348-53.
- Ribot, C., Wang, Y., & Poirier, Y. (2008). Expression analyses of three members of the AtPHO1 family reveal differential interactions between signaling pathways involved in phosphate deficiency and the responses to auxin, cytokinin, and abscisic acid. *Planta*, 227(5), 1025-36.
- Rojas-beltrán, J. A., Dubois, F., Mortiaux, F., Portetelle, D., Gebhardt, C., Sangwan, R. S., & Jardin, P. du. (1999). Identification of cytosolic Mg<sup>2+</sup>-dependent soluble inorganic pyrophosphatases in potato and phylogenetic analysis. *Plant molecular*, 39(3), 449–461.
- Rouached, H., Arpat, A. B., & Poirier, Y. (2010). Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. *Molecular plant*, 3(2), 288-299. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20142416>
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. (S. Krawetz & S. Misener, Eds.) *Methods in Molecular Biology*, 132(3), 365-386.
- Rubio, G., Sorgonà, A., & Lynch, J. P. (2004). Spatial mapping of phosphorus influx in bean root systems using digital autoradiography. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), 2269-2280.

- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A. C., Iglesias, J., Leyva, A., & Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes & development*, *15*(16), 2122-33.
- Rudd, J. J., Franklin, F., Lord, J. M., & Franklin-Tong, V. E. (1996). Increased Phosphorylation of a 26-kD Pollen Protein Is Induced by the Self-Incompatibility Response in *Papaver rhoeas*. *The Plant cell*, *8*(4), 713-724.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., & Moorman, a F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*, *37*(6), 45.
- Rychter, A. M., & Randall, D. D. (1994). The Effect of Phosphate Deficiency on Carbohydrate-Metabolism in Bean Roots. *Physiologia Plantarum*, *91*(3), 383-388.
- Saglio, P., H, Drew, M., C, Pradet, A. (1988). Metabolic acclimation to anoxia induced by low (2-4 kPa) partial pressure oxygen pretreatment (hypoxia) in root tips of *Zea mays*. *Plant Physiology* *86*: 61-66.
- Samygina, V. R., Popov, A. N., Rodina, E. V., Vorobyeva, N. N., Lamzin, V. S., Polyakov, K. M., Kurilova, S. A., et al. (2001). The structures of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase complexed with Ca(2+) or CaPP(i) at atomic resolution and their mechanistic implications. *Journal of molecular biology*, *314*(3), 633-45.
- Sarafian, V., Kim, Y., Poole, R. J., & Rea, P. a. (1992). Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(5), 1775-9.
- Sarafian, V., & Poole, R. J. (1989). Purification of an h-translocating inorganic pyrophosphatase from vacuole membranes of red beet. *Plant physiology*, *91*(1), 34-8.
- Sato, M. H., Maeshima, M., Ohsumi, Y., & Yoshida, M. (1991). Dimeric structure of H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase from pumpkin vacuolar membranes. *FEBS Letters*, *290*(1-2), 177-180.
- Schulze, S., Mant, A., & Kossmann, J. (2004). Identification of an *Arabidopsis* inorganic pyrophosphatase capable of being imported into chloroplasts. *FEBS letters*, *565*, 101-105.
- Schwartz, A., & Ponnampereuma, C. (1968). Phosphorylation on the Primitive Earth: Phosphorylation of Adenosine with Linear Polyphosphate Salts in Aqueous Solution. *Nature*, *218*(5140), 443-443.
- Segami, S., Nakanishi, Y., Sato, M. H., & Maeshima, M. (2010). Quantification, organ-specific accumulation and intracellular localization of type II H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology*, *51*(8), 1350-60.
- Serrano, A., Pérez-Castiñeira, J. R., Baltscheffsky, M., & Baltscheffsky, H. (2007). H<sup>+</sup>-PPases: yesterday, today and tomorrow. *IUBMB life*, *59*(2), 76-83.
- Setter, T. L., & Waters, I. (2003). Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. *Plant and Soil*, *253*(1), 1-34.
- Shin, H., Shin, H.-S., Chen, R., & Harrison, M. J. (2006). Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *The Plant journal*, *45*(5), 712-26.
- Shintani, T. (1998). Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence for a new family of enzymes. *FEBS Letters*, *439*(3), 263-266.
- Shiratake, K., Kanayama, Y., Maeshima, M., & Yamaki, S. (1997). Changes in H<sup>(+)</sup>-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. *Plant & cell physiology*, *38*(9), 1039-45.
- Simmons, S., & Butler, L. G. (1969). Alkaline inorganic pyrophosphatase of maize leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *172*(1), 150-157.
- Sivula, T., Salminen, A., Parfenyev, A. N., Pohjanjoki, P., Goldman, A., Cooperman, B. S., Baykov, A. A., et al. (1999). Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Letters*, *454*(1-2), 75-80.
- Smith, F. W., Ealing, P. M., Dong, B., & Delhaize, E. (1997). The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *The Plant Journal*, *11*(1), 83-92.

- Sonnewald, U. (1992). Expression of *E. coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning. *The Plant Journal*, 2(4), 571-581.
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17:616-627
- Stefanovic, A., Ribot, C., Rouached, H., Wang, Y., Chong, J., Belbahri, L., Delessert, S., *et al.* (2007). Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *The Plant journal*, 50(6), 982-94.
- Sternberg, G., & Wilson, J. W. (2004). *Native Trees for North American Landscapes: From the Atlantic to the Rockies* (p. 552). Phoenix, AZ, U.S.A.: Timber Press.
- Stitt, M. (1998). Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Botanica acta*, 167-175.
- Stoimenova, M., Libourel, I.,G.,L., Ratcliffe, R.,G., Kaiser, W.,M. (2003). The role of nitrate reduction in the anoxic metabolism of roots II. Anoxic metabolism of tobacco roots with or without nitrate reductase activity. *Plant Soil* 253:155–67
- Takase T, Nakazawa M, Ishikawa A, Kawashima M, Ichikawa T, Takahashi N, Shimada H, Manabe K, Matsui M (2004) ydk1-D, an auxin-responsive GH3 mutant that is involved in hypocotyl and root elongation. *Plant J* 37:471 – 483
- Takaso T, Tomlinson PB (1990) Cone and ovule ontogeny in *Taxodium* and *Glyptostrobus* (Taxodiaceae-Coniferales). *American Journal Botany* 77: 1209-1221
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Tanaka, S, Mochizuki N, Nagatani A (2002) Expression of the AtGH3a gene, an Arabidopsis homologue of the soybean GH3 gene, is regulated by phytochrome B. *Plant Cell Physiol* 43:281-289
- Tepperman, J.,M., Zhu, T, Chang, H.,S., Wang, X, Quail P.,H (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9437 – 9442
- Theodorou, M. E., & Plaxton, W. C. (1993). Metabolic Adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology*, 101(2), 339-344.
- Tian, J., Venkatachalam, P., Liao, H., Yan, X., & Raghothama, K. (2007). Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta*, 227(1), 151–165.
- Ticconi, C. A., & Abel, S. (2004). Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends in plant science*, 9(11), 548-55.
- Tomasi, N., Kretschmar, T., Espen, L., Weisskopf, L., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Neumann, G., *et al.* (2009). Plasma membrane H-ATPase-dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate-deficient white lupin. *Plant, cell & environment*, 32(5), 465-75.
- Tuominen, H., Salminen, A., Oksanen, E., Jämsen, J., Heikkilä, O., Lehtiö, L., Magretova, N. N., *et al.* (2010). Crystal structures of the CBS and DRTGG domains of the regulatory region of *Clostridium perfringens* pyrophosphatase complexed with the inhibitor, AMP, and activator, diadenosine tetraphosphate. *Journal of molecular biology*, 398(3), 400-413.
- Valdés-López, O., Arenas-Huertero, C., Ramírez, M., Girard, L., Sánchez, F., Vance, C. P., Luis Reyes, J., *et al.* (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant cell environment*, 31(12), 1834-1843.
- Valdés-López, O., & Hernández, G. (2008). Transcriptional regulation and signaling in phosphorus starvation: what about legumes? *Journal of integrative plant biology*, 50(10), 1213-1222.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal

control genes. *Genome biology*, 3(7),

Vassey, T., L., Sharkey T. D. (1989) Water Stress of Phaseolus vulgaris Plants Leads to Reduced Starch Synthesis and Extractable Sucrose *Plant Physiology*. 89, 1066-1070.

#### Phosphate Synthase Activity

Versaw, W. K. (2002). A Chloroplast Phosphate Transporter, PHT2;1, Influences Allocation of Phosphate within the Plant and Phosphate-Starvation Responses. *The plant cell*, 14(8), 1751-1766.

Voesenek, L. a C. J., Colmer, T. D., Pierik, R., Millenaar, F. F., & Peeters, a J. M. (2006). How plants cope with complete submergence. *The New phytologist*, 170(2), 213-226.

Wanke, M. (1998). Response to Phosphate Deficiency in Bean (Phaseolus vulgarisL.) Roots. Respiratory Metabolism, Sugar Localization and Changes in Ultrastructure of Bean Root Cells. *Annals of Botany*, 82(6), 809-819.

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.

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

Williamson, L. C., Ribrioux, S. P., Fitter, a H., & Leyser, H. M. (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant physiology*, 126(2), 875-82.

Wykoff, D. D., Grossman, a R., Weeks, D. P., Usuda, H., & Shimogawara, K. (1999). Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in Chlamydomonas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15336-15341.

Yan, F., Zhu, Y., Müller, C., Zörb, C., & Schubert, S. (2002). Adaptation of H<sup>+</sup>-pumping and plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology*, 129(May), 50-63.

Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. K., Murphy, A., et al. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Plant biotechnology journal*, 5(6), 735-745.

Yang, X. J., & Finnegan, P. M. (2010). Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Annals of botany*, 105(4), 513-526.

Yang, Z., & Wensel, T. G. (1992). Inorganic pyrophosphatase from bovine retinal rod outer segments, *J. Biol. Chem.*, 267, 24634-24640.

Yazaki, Y., Asukagawa, N., & Ishikawa, Y. (1988). Estimation of cytoplasmic free Mg<sup>2+</sup> levels and phosphorylation potentials in mung bean root tips by in vivo <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Plant and cell*.

Yi, K., Wu, Z., Zhou, J., Du, L., Guo, L., & Wu, Y. (2005). OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant physiology*, 138, 2087-2096.

Young, T. W., Kuhn, N. J., Wadson, A., Ward, S., Burges, D., & Cooke, G. D. (1998). Bacillus subtilis ORF yybQ encodes a manganese-dependent inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of soluble pyrophosphatase? *Microbiology*, 144(9), 2563-2571.

Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.

Zhou, J., Jiao, F., Wu, Z., Li, Y., Wang, X., He, X., Zhong, W., et al. (2008). OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant physiology*, 146(4), 1673-1686.

de Graaf, B. H. J., Rudd, J. J., Wheeler, M. J., Perry, R. M., Bell, E. M., Osman, K., Franklin, F. C. H., et al. (2006). Self-incompatibility in Papaver targets soluble inorganic pyrophosphatases in pollen. *Nature*, 444(7118), 490-493.

- 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.
- van Dongen, J. T., Schurr, U., Pfister, M., Geigenberger, P. (2003). Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiology*. 131 1529–43