



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA INORGÁNICA
SOLUBLE EN RESPUESTA A LA DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO EN
PLANTAS *Arabidopsis thaliana* DE MUTANTES, CARENTES DE
LA PIROFOSFATASA ISOFORMA 5**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ NORMANDIA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

VOCAL: SOBEIDA SANCHEZ NIETO

SECRETARIO: JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ

1ER. SUPLENTE: JOSÉ IGNACIO PARAMO RAMÍREZ

2° SUPLENTE: LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 115 EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. LILIAN GABRIELA VALENCIA TURCOTTE

SUSTENTANTE:

MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ NORMANDIA

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Fernando Martínez López y Sara Normandía Martínez por ser mi todo y mi ejemplo a seguir, que me dieron y me siguen dando tanto. Son los mejores padres del mundo. Gracias por enseñarme todo, los amo.

A mis maravillosas hermanas Sara Elena, Leticia y Edith, mujeres maravillosas e inteligentes, serán siempre mis mejores amigas y la luz de mis días difíciles.

A José Alberto por estar conmigo y siempre ser mi amigo. Te amo.

Con mucha gratitud al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por la paciencia y la ayuda que me brindo siempre, por dejarme aprender tanto en su laboratorio y no olvidarse de mí. Gracias Doc.

A la M. en C. Lillian Valencia Turcotte que gracias a ella me fue posible terminar este trabajo y que su ayuda es para mí invaluable. Te agradezco enormemente que nunca me dejaras rendirme y que siempre estuvieras ahí para responder todas mis dudas, además de enseñarme tanto en el laboratorio. Muchísimas gracias Lillian.

DEDICATORIAS

Mamá te dedico este trabajo, por que definitivamente sin tí nunca lo hubiera terminado, gracias por darme tanto sí pedir nada a cambio. Gracias por ser una magnífica y excelente madre. Te amo.

A mi gordis Carmen Ximena que es la luz de mis ojos y la risa de mi vida, siempre todo es y será para tí, te amo.

A Karla Mariana Castañeda Luna, porque hiciste que mis días en la facultad fueran inolvidables y sin tu ayuda y apoyo jamás hubiera podido titularme. Gracias por ser mi amiga.

I.	INDICE	
I.	Índice.....	3
II.	Abreviaturas.....	6
III.	Índice de figuras	9
IV.	Índice de tablas.....	11
1.	Resumen.....	13
2.	Introducción.....	16
3.	Antecedentes.....	20
3.1.-	Nutrición de las plantas.....	20
3.1.1.-	Fósforo.....	21
3.1.2.-	Pirofosfato.....	23
3.2.-	Pirofosfatasas.....	24
3.3.-	Pirofosfatasas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
3.4.-	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
3.5.-	Respuesta de <i>Arabidopsis thaliana</i> ante condiciones de estrés biológico y adaptaciones fisiológicas.....	29
3.5.1.-	Respuesta a alto fosfato.....	30
3.5.2.-	Respuesta a deficiencia de fosfato.....	31

4. Hipótesis.....	33
5. Objetivo.....	34
6. Materiales y métodos.....	35
6.1.-Materiales.....	35
6.1.1.-Materiales y equipo de laboratorio.....	35
6.1.2.-Material biológico.....	35
6.1.3.-Soluciones.....	35
6.2.-Métodos.....	44
6.2.1.-Preparación del medio de crecimiento.....	44
6.2.2.-Germinación de semillas, crecimiento de plantas y selección de plantas mutantes.....	44
6.2.3.-Extracción de proteína.....	45
6.2.4.-Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	46
6.2.5.-Fraccionamiento de actividad de la pirofosfatasa en columna de fenilsefarosa.....	46
6.2.6.-Medición de actividad de pirofosfatasa.....	47
6.2.7.-Medición de absorbencias de las fracciones.....	47
6.2.8.-Desalación de fracciones.....	47

6.2.9.-Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	48
6.2.10.-Tinción de geles con nitrato de plata.....	48
7. Resultados y análisis.....	50
7.1.- Selección de las plantas mutantes AtΔPPa5.....	50
7.2.-Cuantificación de la concentración de proteína en el extracto crudo fresco de las plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo los diferentes tratamientos.....	52
7.3.- Cuantificación de la actividad proteína pirofosfatasa en el extracto crudo fresco de las plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo los diferentes tratamientos.....	54
7.4.- Fraccionamiento en columna de los diferentes tratamientos para las plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> wt y la mutante AtΔPPa5.....	56
7.5.- Geles de electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) para los máximos de actividad del fraccionamiento en columna de los distintos tratamientos para las plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> wt y la mutante AtΔPPa5.....	68
8. Conclusiones.....	73
9. Perspectivas.....	74
10. Bibliografía citada.....	76

II. ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
μ	Prefijo micro del Sistema Internacional que indica un factor de 10^{-6}
ATP	Adenosinatrifosfato
AtPPa	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtΔPPa5	Pirofosfatasa inorgánica soluble de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutante de la isoforma cinco
B	Boro
C	Carbono
Ca	Calcio
Cl	Cloro
Co²⁺	Ion Cobalto
Co	Cobalto
Cu	Cobre
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
Fe	Hierro

G	Gramo
GTP	Guanosinatrifosfato
H	Hidrogeno
H	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
K	Potasio
L	Litro
M	Molaridad
Mg	Magnesio
Mg²⁺	Ion Magnesio
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
Min	Minuto
Mn	Manganeso
Mn²⁺	Ion Manganeso
Mo	Molibdeno
iPPasas	Pirofosfatasas inorgánicas solubles
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de Sodio
NAD⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADP⁻	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

(NH₄)₂SO₄	Sulfato de Amonio
O	Oxígeno
P	Fósforo
PESTANAL®	Nombre comercial del Glufosinato de Amonio
PH	Potencial de hidrogeno
Pi	Fosfato inorgánico
PPI	Pirofosfato
S	Azufre
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
tDNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
Wt	“Wild Tipe” o planta silvestre utilizada como control
Zn	Zinc

III. INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Reacción de hidrólisis del pirofosfato catalizada por las pirofosfatasas inorgánicas solubles.....	24
Figura 2.- Nivel de expresión de mRNA de las seis AtΔPPasas de <i>A. thaliana</i> [Navarro, 2009].....	27
Figura 3.- Fenotipo de las plantas wt y mutante AtΔppA5 en el tratamiento por deficiencia de fosfato.....	51
Figura 4.- Fenotipo de las plantas wt y mutante AtΔPPa5 en tratamiento por alto fosfato.....	51
Figura 5.- Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas silvestres (wt) de <i>A. thaliana</i> crecidas en condiciones control.	58
Figura 6.- Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas silvestres (wt) de <i>A. thaliana</i> crecidas en condiciones de exceso de fosfato.....	59
Figura 7.- Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas silvestres (wt) de <i>A. thaliana</i> crecidas en condiciones de bajo fosfato.....	60

Figura 8.- Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas mutantes At Δ PPa de <i>A. thaliana</i> crecidas en condiciones control.....	62
Figura 9.- Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas mutantes At Δ PPa5 de <i>A. thaliana</i> crecidas en condiciones de alto fosfato.....	63
Figura 10.- Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas mutantes At Δ PPa de <i>A. thaliana</i> crecidas en condiciones de bajo fosfato.....	65
Figura 11.- Perfil electroforético de proteínas de plantas wt crecidas en condiciones control.....	69
Figura 12.- Perfil electroforético de plantas wt crecidas en condiciones de alto fosfato.....	70
Figura 13.- Perfil electroforético de plantas mutantes At Δ PPa5 crecidas en condiciones control.....	71
Figura 14.- Perfil electroforético de plantas mutantes At Δ PPa5 crecidas en condiciones de alto fosfato.....	72

IV. INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Concentración de nutrientes para medio de control y tratamiento con estrés por inanición o alto fosfato.....	36
Tabla 2.- Amortiguador de extracción de proteína.....	37
Tabla 3.- Amortiguador de elución A.....	37
Tabla 4.- Amortiguador de elución B.....	38
Tabla 5.- Amortiguador de elución C.....	38
Tabla 6.- Amortiguador para medir actividad pirofosfatasa con Magnesio.....	39
Tabla 7.- Amortiguador para medir actividad pirofosfatasa sin Magnesio.....	39
Tabla 8.- Reactivo de trabajo verde de Malaquita.....	39
Tabla 9.- Amortiguador de resuspensión de proteína.....	40
Tabla 10.- Amortiguador de carga para SDS-PAGE.....	40
Tabla 11.- Concentración de soluciones para preparar gel de electroforesis desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	41
Tabla 12.- Solución de tinción.....	41
Tabla 13.- Solución sensibilizadora.....	42
Tabla 14.- Solución de plata.....	42

Tabla 15. -Solución de desarrollo.....	42
Tabla 16. -Solución de paro.....	43
Tabla 17. -Concentración de proteína en los extractos crudos de plantas de <i>A. thaliana</i> wt y planta mutante At Δ PPa 5 bajo diferentes tratamientos.....	53
Tabla 18. -Actividad pirofosfatasa del extracto crudo de <i>A. thaliana</i> wt y la planta mutante At Δ PPa5 bajo diferentes tratamientos.....	55
Tabla 19. -Actividad específica de pirofosfatasa del extracto crudo de <i>A. thaliana</i> wt y la planta mutante At Δ PPa5 bajo diferentes tratamientos.....	56

1. RESUMEN

El Fósforo juega un papel vital en todos los procesos que requieren transferencia de energía en la planta, jugando un papel crítico en la conversión y manejo de ésta, en los nucleótidos fosfatados, como ATP, GTP, FAD y NADP⁺, y en la regulación de la actividad de muchas enzimas y proteínas de diversas actividades celulares y metabólicas, incluyendo aquellas relacionadas con la regulación de la expresión genética. La concentración del fosfato inorgánico asimilable para las plantas en el suelo nunca rebasa el 10⁻⁶ M, por lo que las plantas han desarrollado estrategias para tomarlo de manera eficiente, así como habilidades fisiológicas para aprovechar de manera óptima la cantidad asimilada de este macronutriente.

Las pirofosfatasa inorgánicas solubles son esenciales para los seres vivos cuya función es eliminar el pirofosfato que se genera como subproducto durante la biosíntesis de macromoléculas. Diversas evidencias del laboratorio del Dr. Rodríguez Sotres indican que estas enzimas tienen un papel importante en la tolerancia al estrés por deficiencia de Fósforo y datos en la literatura sugieren su participación en la respuesta a otros tipos de estrés. La planta modelo *A. thaliana* posee seis genes que codifican para pirofosfatasa inorgánicas solubles (AtPPa 1 a 6), cinco de las proteínas se localizan en el citoplasma. Se ignora si estas isoformas son redundantes, sin embargo, datos previos a este trabajo indican que este no es el caso.

En el laboratorio se tienen mutantes que poseen inserciones de tDNA en los genes AtPPa1, AtPPa2, AtPPa4 y AtPPa5. Las dos primeras han sido estudiadas en un trabajo previo y se encontró que su respuesta a condiciones de estrés está alterada.

En el presente trabajo se determinó la actividad de pirofosfatasa en extractos de hojas de plantas de *A.thaliana* silvestre y de la mutante At Δ PPa5, ambas crecidas en condiciones de estrés. Las condiciones a las que se sometieron durante su desarrollo fueron condiciones control de Fósforo (1 mM K₂HPO₄), inanición de Fósforo (1 mM K₂SO₄) y exceso de fosforo (2.5 mM K₂HPO₄). En estudios anteriores realizados en el laboratorio se caracterizó fisiológicamente a la mutante AtPPa5 bajo condiciones óptimas de crecimiento y bajo condiciones de estrés salino, térmico y por deficiencia de fosfato y alto fosfato. Se encontró que la planta mutante crece menos que la silvestre en condiciones control, pero lo hace mejor bajo condiciones de estrés abiótico; en particular, bajo estrés térmico (1 h a la semana a 37 °C), salino (35 mM NaCl) y de fosfato alto (2.5 mM de PO₄³⁻).

La germinación de las semillas se realizó por estratificación. Las plantas mutantes a At Δ PPa5 se les asperjó con una solución de herbicida PESTANAL® (50 μ M) para seleccionar las plantas puesto que la mutación está ligada a la resistencia a éste herbicida.

En el presente estudio se pudo observar que la mutantes AtPPa5 tiene mayor cantidad de hojas pero menor tamaño en los tratamientos control y bajo fosfato con respecto a la planta silvestre (wt). Adicionalmente se encontró que hay mayor

cantidad de proteína en condiciones control y de menor fosfato, y una menor afectación cuando hay menos fosfato en la mutante AtPPa5 que en la wt.

En el estudio realizado se pudo observar que los cambios realizados en la actividad de pirofosfatasa que se obtuvieron en la planta silvestre, bajo los diferentes estados de nutrición, fueron distintos a los presentados en la mutante AtPPa5, que se deben a la ausencia de la isoforma 5 y a la respuesta a las pirofosfatasas inorgánicas solubles restantes.

2. INTRODUCCIÓN

La producción de alimentos requiere de mejores técnicas agrícolas debido a que cada vez hay menos suelos disponibles y mayor demanda de alimentos. Estos métodos deben además ser amigables al medio ambiente, por lo que es deseable reducir la aplicación de fertilizantes y plaguicidas. Sin embargo, para poder obtener la productividad requerida sin incrementar el uso de agroquímicos es necesario entender mejor el comportamiento de las plantas bajo condiciones ambientales diversas.

A medida que la producción mundial de alimentos se ha expandido para satisfacer la creciente demanda, los suelos se han ido empobreciendo, al grado que la pérdida en la calidad agrícola de los suelos hace necesaria la aplicación de fertilizantes, medida poco exitosa para revertir el deterioro.

Las plantas deben obtener de su entorno las materias primas específicas necesarias para las complejas reacciones bioquímicas implicadas en el mantenimiento de sus células y en el crecimiento. Gran parte de la evolución de las plantas se ha debido a una especialización estructural y funcional para optimizar la adquisición de estas materias primas y su distribución a todas las células vivas de la planta [Raven *et al.*, 1999].

Así como todos los seres vivos, las plantas requieren de un aporte nutrimental completo para sostener su crecimiento y las funciones normales. La deficiencia de algún factor nutrimental se manifiesta en alteraciones fisiológicas, que impactan en

su morfología, desarrollo y, por lo tanto, merman parcial o totalmente su productividad agrícola.

En las plantas la nutrición por Fósforo está limitada a la disponibilidad de sus formas solubles en el suelo, orillando a la disminución del crecimiento de ellas en ecosistemas naturales, por lo que el Fósforo, junto con el Nitrógeno se ha convertido en el fertilizante más empleado en la agricultura intensiva [Kochian, 2000]. El Fósforo puede existir en la plantas en diversas formas de aniones inorgánicos y formando parte de compuestos organofosfatados [Smith, 2000].

Para tratar de solucionar este problema de baja disponibilidad de Fósforo, en los sistemas agrícolas se ha intensificado el uso de fertilizantes fosfatados, principalmente como superfosfato de calcio triple, y se ha observado que el uso de este fertilizante es efectivo para mejorar la productividad de los cultivos, sin embargo, no todo el fosfato añadido es eficientemente asimilado y, mucho fertilizante se desperdicia, llegando incluso a convertirse en un problema de contaminación para diversos ecosistemas acuáticos [Horst *et al.*, 2001], teniendo entonces un impacto ecológico negativo. El exceso de minerales se lava hacia los ríos y mares, afectando el equilibrio de los ecosistemas [Lynch, 1998].

El Pirofosfato (PPi) es un metabolito importante en el metabolismo de Fósforo en las plantas. En particular, los estudios demuestran que posee importancia durante la deficiencia de Fósforo, ya que a pesar de que haya poco fosfato disponible, la concentración de PPi en la planta se mantiene [Rycher y Randall, 1994].

Las enzimas que degradan el PPI son las pirofosfatasas (PPasa) y son esenciales, porque permiten el reaprovechamiento del Fósforo para la célula. Las pirofosfatasas están presentes en todos los seres vivos, pues impulsan la síntesis de biomoléculas como el DNA, el RNA, las proteínas, el almidón o el glucógeno y varias más [Korngber, 1962].

En las plantas se ha observado que cuando se encuentran sometidas a estrés por deficiencia de fosfato inorgánico (Pi) se mantienen los niveles PPI en las células aún cuando la concentración de otros compuestos como ATP y todos los nucleótidos disminuye significativamente [Kôck *et al.*, 2010]. Las pirofosfatasas inorgánicas solubles (iPPasas) son enzimas ubicuas en los seres vivos y están encargadas de mantener la disponibilidad de Pi en las células mediante la hidrólisis de PPI en dos moléculas de Pi. El PPI es producido principalmente como subproducto de muchas reacciones biosintéticas que utilizan ATP (u otros nucleótidos trifosfatados) [Cooperman *et al.*, 1992].

En este trabajo, el modelo elegido fue *A. thaliana*, ya que se cuenta con muchos recursos genéticos. El tamaño de su genoma, organizado en 5 cromosomas, es uno de los más pequeños detectados en las plantas de 125 Mb. Es fácilmente transformable empleando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* [Clough y Bent, 1998]. Además de las ventajas naturales de la planta, la investigación de genómica funcional de *Arabidopsis* es utilizada ya que está disponible la secuencia de su genoma y en el laboratorio se cuentan con mutantes que carecen de diversas proteínas pirofosfatasas. En este estudio, se exploró la planta mutante

de *A. thaliana* carente de la proteína PPasa isoforma cinco (At Δ PPa5) y la planta *A. thaliana* silvestre (wt), crecida bajo condiciones óptimas de nutrición o condiciones de alto fosfato y ausencia de fosfato en el medio, generando condiciones de estrés durante el desarrollo de la planta.

3. ANTECEDENTES

3.1 Nutrición de las plantas

Las plantas deben de obtener de su entorno las materias primas específicas necesarias para las complejas reacciones bioquímicas implicadas en el mantenimiento de sus células y en el crecimiento. Gran parte de la evolución de las plantas se ha debido a una especialización estructural y funcional para optimizar la adquisición de estas materias primas y su distribución a todas las células vivas de la planta [Raven *et al.*, 1999].

Así como todos los seres vivos, las plantas requieren de un aporte nutrimental completo para sostener su crecimiento y funciones normales. La deficiencia de algún factor nutrimental se manifiesta en alteraciones fisiológicas, que impactan en su morfología, desarrollo y, por lo tanto, merman parcial o totalmente su productividad agrícola.

Los nutrimentos minerales esenciales para los vegetales superiores se subdividen en macro y micronutrientes, los cuales se encuentran en forma de sales disueltas y asociadas con arcillas y arenas, mientras que el aporte de dióxido de carbono, hidrógeno y oxígeno puede tenerlo a través de la atmósfera y agua de lluvia [Navarro, 2005].

Dentro de los macronutrientes se incluye al Hidrogeno (H), Carbono (C), Nitrógeno (N), Oxígeno (O), Fósforo (P), Azufre (S) y Potasio (K), mientras que los

micronutrientes son Magnesio (Mg), Calcio (Ca), Zinc (Zn), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Molibdeno (Mo), Boro (B), Cobre (Cu), Cobalto (Co) y Cloro (Cl). Todos y cada uno de estos nutrimentos deben ser absorbidos por las plantas desde el suelo, pero son el P y el N los nutrimentos que con mayor frecuencia resultan limitantes a la producción agrícola de cultivos vegetales, ya que a pesar de encontrarse en cantidades relativamente altas, no se encuentran en forma directamente asimilable [Raghothama, 1999 y Coello, 2001].

3.1.1 Fósforo

Los macronutrientes que necesitan las plantas para su óptimo desarrollo muchas veces se encuentran como limitantes entre ellos está el Fósforo. Existe de manera natural en distintas proporciones en la atmosfera y corteza terrestre. En la corteza terrestre se encuentra en forma de sales insolubles y es asimilado por las plantas únicamente como ion fosfato inorgánico (Pi) [Holford, 1997].

Habitualmente, el Pi se encuentra en la tierra en concentraciones menores que algunos micronutrientes siendo la concentración del Pi aún en tierras fértiles pocas veces mayor a 10 μM [Raghothama, 1999]. El Pi tiene la peculiaridad de reaccionar con otros nutrientes existentes en la tierra y algunos estudios han demostrado que hasta el 80% de Pi aplicado como fertilizante es fijado por la tierra [Schachtman *et al.*, 1998]. Sus funciones no pueden ser cubiertas por ningún otro nutriente y se requiere un adecuado suplemento de Fósforo para que la planta crezca y se reproduzca de forma adecuada. El Fósforo se clasifica como un

nutrimento primario, pero sus formas minerales son poco solubles, razón por la cual, es comúnmente causa de limitaciones en la producción agrícola y la agricultura intensiva requiere de la aplicación de fertilizantes fosfatados en cantidades relativamente grandes.

El Fósforo es un componente básico de las nucleoproteínas, los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, así como de todas las enzimas involucradas en el transporte de energía. El Fósforo es esencial para ciertos procesos como la fosforilación, fotosíntesis, la respiración y el transporte de energía y para la síntesis de carbohidratos, proteínas y lípidos. La deficiencia de Fósforo es muy común en suelos ácidos que tienen niveles elevados de hierro y aluminio [Reinhardt y Howeler, 1987].

Las plantas adquieren el Fósforo de la tierra cuando este se encuentra como ion ortofosfato H_2PO_4^- o HPO_4^{2-} , dependiendo del pH de la tierra. Para mantener los niveles celulares necesarios para el funcionamiento normal de una planta, debe existir una combinación eficiente entre la absorción del fosfato y su translocación. Por lo que, debido a la baja concentración de fosfato en la tierra (que rara vez supera una concentración de $10 \mu\text{M}$), las plantas se han adaptado desarrollando diferentes estrategias morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares para una mejor absorción y aprovechamiento del fosfato [Raghothama, 1999; Raghothama *et al.*, 2004 y Gaxiola *et al.*, 2011].

3.1.2 Pirofosfato

Una de las fuentes directas de Fósforo en las células de todos los seres vivos es el PPI, producido durante numerosas actividades metabólicas y cuya hidrólisis inmediata constituye una manera eficiente de mejorar la disponibilidad de Fósforo inorgánico [Cori *et al.*, 1951]. Se sabe que es un subproducto biológico de las reacciones de biosíntesis de ácidos nucleicos, de carbohidratos y de proteínas [Kornberg *et al.*, 1999].

El PPI es un compuesto fosforilado producto de la condensación de dos moléculas de ortofosfato para dar un compuesto anhídrido ($O_3P-O-PO_3^{4-}$). Es además un subproducto por excelencia de diversas reacciones anabólicas, por lo que su producción está estrechamente relacionada con el crecimiento de los seres vivos [Lara-Nuñez *et al.*, 2001]. Mediante su hidrólisis proporciona un empuje termodinámico a un gran número de reacciones biosintéticas y, en muchos organismos, sirve como intermediario en rutas metabólicas tales como la degradación de sacarosa y almidón [Mansurova, 1989; Heinonen, 2001 y Perales Baños, 2008].

El PPI fue descubierto en el siglo XIX, al calentar sales de ortofosfato de sodio o potasio, sin embargo, su formación en sistemas biológicos fue reportada hasta 1941 por Cori, al analizar extractos de rata incubados aeróbicamente en presencia de succinato y fructosa [Gaytán, 2013]. Es una molécula sencilla constituida por dos grupos metafosfato unidos por un puente de oxígeno (o dos ortofosfato unidos por un enlace fosfoanhídrido) y es el polímero de fosfato más pequeño. La

hidrólisis de PPI en dos moléculas de Pi se lleva a cabo gracias a la presencia de Pirofosfatasas (iPPasa) (Figura 1), enzimas ubicuas en los organismos vivos. La reacción de hidrólisis es una reacción altamente exergónica ($\Delta G^{\circ} = -33.5 \text{ kJ mol}^{-1}$), lo que compensa los valores de ΔG° cercanos a cero de muchas de las reacciones biosintéticas de pirofosforólisis y que proporciona la fuerza termodinámica impulsora para muchos procesos anabólicos [Kornberg, 1962]

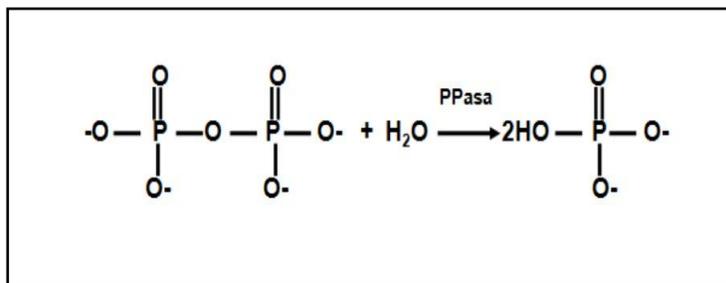


Fig. 1.-Reacción de hidrólisis del pirofosfato catalizada por las pirofosfatasas inorgánicas solubles

3.2 Pirofosfatasas (iPPasa)

Las iPPasa son las enzimas encargadas de la hidrólisis del PPI como ya se mencionó es subproducto por excelencia de reacciones del metabolismo de síntesis de varias macromoléculas y considerado también como fuente de energía autónoma en las plantas, actuando como una alternativa al ATP [Dancew *et al.*, 1990] y cuya producción está estrechamente relacionada con el crecimiento de las plantas [Lara-Núñez *et al.*, 2001]. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de PPI a dos moléculas de Pi, en presencia de un catión divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+})

favoreciendo el equilibrio termodinámico de muchas reacciones biosintéticas [Kornber, 1962].

Todas las iPPasas hidrolizan al PPI produciendo Pi libre, son enzimas muy activas, con gran afinidad por su sustrato y son consideradas catalizadores perfectos (es decir su actividad está limitada sólo por la difusión del sustrato hacia la enzima). Están presentes en todos los seres vivos, siendo esenciales para la supervivencia de las células [Heinonen, 2001]. Estas pueden subdividirse en tres familias, de acuerdo a sus características; las pirofosfatasas de protones, como la de la membrana vacuolar [Maeshima *et al.*, 1996] y de aparato de Golgi [Mitsuda *et al.*, 2001], que acoplan la hidrólisis del PPI a la generación de un gradiente electroquímico. Otro grupo lo conforman las iPPasas solubles que utilizan Mg²⁺ como cofactor exclusivo, las cuales se encuentran en forma ubicua en las células de plantas, animales y hongos [Sivula *et al.*, 1999]. Una tercera familia utiliza como cofactor Mn²⁺ y/o Co²⁺ y se encuentra en las bacterias, exclusivamente [Kuhn y Ward, 1998].

3.3 Pirofosfatasas de *Arabidopsis thaliana* (AtPPasas)

A. thaliana cuenta con seis isoenzimas (AtPPa1, AtPPa2, AtPPa3, AtPPa4, AtPPa5 y AtPPa6), con una similitud promedio entre ellas de casi el 79%, se sabe que los mensajeros de al menos cinco de ellas se expresan abundantemente en casi todos los tejidos a cualquier edad de la planta [Navarro *et al.*, 2007], mientras que la sexta tiene una secuencia más larga de aminoácidos, pero precedida por

un péptido de tránsito al cloroplasto de manera que la proteína madura es ligeramente más pequeña. Ésta última proteína sólo cuenta con una semejanza del 22% respecto a las demás [Schulze *et al.*, 2004], y su secuencia de aminoácidos está más emparentada con la pirofosfatasa de la levadura [Gómez *et al.*, 2006]. Se sabe que los mensajeros de al menos cinco de ellas se expresan abundantemente en casi todos a cualquier edad de la planta [Navarro *et al.*, 2007].

En el laboratorio del Dr. Rodríguez Sotres se caracterizaron cinética y molecularmente a las isoenzimas AtPPa1 y AtPPa4, encontrando que ambas proteínas tienen una alta especificidad a PPI y son activadas por Mg^{2+} [Navarro, 2005]. La isoenzima AtPPa6 también es dependiente de Mg^{2+} y su pH óptimo es de 7.5 [Schulze *et al.*, 2004]. En el mismo laboratorio también se ha estudiado la localización de las diferentes isoformas en los compartimientos celulares mediante la ligación de una proteína fluorescente al gen de la AtPPasa. Se encontró que AtPPa1 se localiza preferentemente en regiones citosólicas encontrándose también, aunque en menor proporción, en el núcleo de las células. Las AtPPa2 y AtPPa3 se localizan exclusivamente en citosol. La isoforma AtPPa4 no se localizó claramente en *A. thaliana*, mientras que la isoforma AtPPa5 fue localizada en el citosol y en otras partículas que podrían ser mitocondrias, pero cuya identidad no fue establecida con certeza [Navarro, 2009]. La isoenzima AtPPa6, al menos en experimentos de importación *in vitro*, se localiza principalmente en cloroplastos [Schulze *et al.*, 2004].

Se ha reportado el nivel de expresión de las diferentes isoenzimas AtPPasas de *A. thaliana* a través de estrategias de biología molecular y de microarreglos. En la Figura 2 se observa la expresión de las AtPPasas en cada uno de los órganos en las diferentes etapas del desarrollo de la planta.

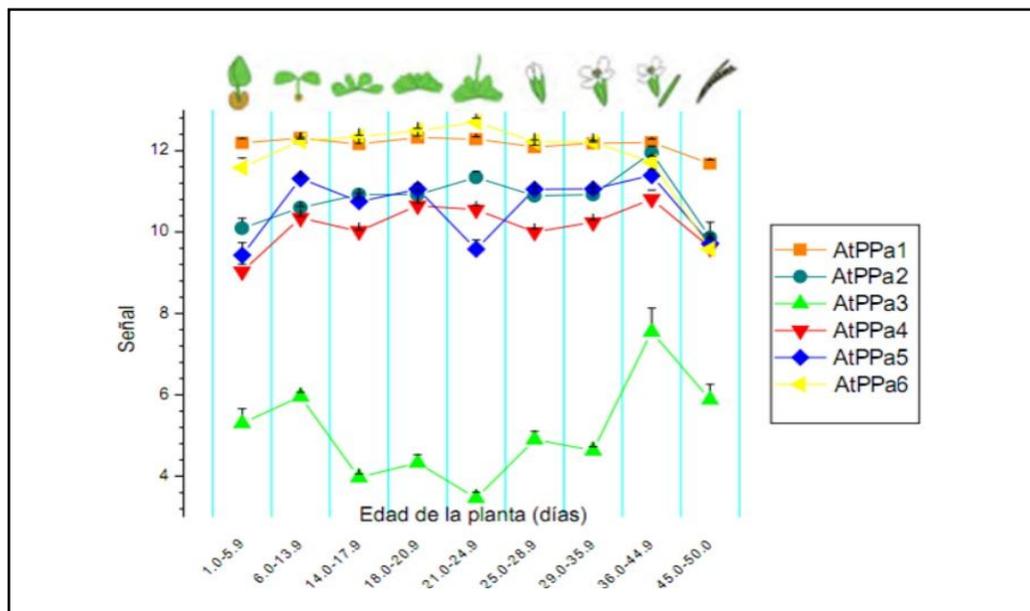


Figura 2.- Nivel de expresión de mRNA de las seis At Δ PPasas de *A. thaliana* [Navarro, 2009]

3.4 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Una de las herramientas esenciales en el estudio del análisis funcional de los genes, en un organismo cuyo genoma haya sido completamente secuenciado, es la de generar la pérdida de la función de uno o más genes. Para lograrlo una estrategia frecuente en *A. thaliana* y en otras plantas es utilizar a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* [Alonso et al., 2003].

Agrobacterium tumefaciens, un fitopatógeno presente en la tierra, es capaz de transformar genéticamente a diversas plantas dicotiledóneas, infectando por medio de heridas y causando tumores conocidos como agallas de cuello o corona. Durante la transformación, la bacteria transfiere un segmento específico de su DNA, una copia del llamado tDNA (secuencia T). El tDNA es parte de un plásmido de gran tamaño, denominado plásmido Ti por su capacidad inductora de tumores. Se encuentra delimitado por dos secuencias de 25-pb de repeticiones directas, llamadas bordes del tDNA. Cualquier secuencia de DNA contenida entre estos bordes, será transferida a la planta. En contraste con otros segmentos de DNA móviles, el tDNA posee información para autotransferirse. Sin embargo, dentro del plásmido Ti se encuentran genes *vir*, que son activados por proteínas liberadas por la planta (*VirA*, *VirB*, *VirC*, *VirD*, *VirG*,...). Estos genes contienen la información necesaria para generar, cortar y transferir la secuencia-T (una copia de cadena sencilla del tDNA) de la célula bacteriana a la célula de la planta. Cuando la secuencia T se encuentra en el núcleo de la planta, ésta se integra a un cromosoma [Stachel y Nester, 1986; Zupupan y Zambryski, 1995].

El fragmento de tDNA contenido en dicho plásmido ha sido manipulado mediante ingeniería genética, para eliminar las secuencias de interés y mutar el gen objetivo. A esta secuencia se le inserta también un marcador, un gen de resistencia a un herbicida o antibiótico, que permita seleccionar las plantas transformadas. Lo anterior es posible debido a que los intrones de *A. thaliana* son muy pequeños, por lo que, una inserción de tDNA de una longitud de 5 a 25 Kb en un exón de un gen de la planta causa la interrupción de la secuencia del gen, lo

que lleva a la pérdida del mensaje y de la función de dicho gen. Las transformaciones se realizan al azar y, posteriormente, utilizando oligonucleótidos dirigidos a la secuencia insertada en el vector para secuenciar fragmentos de DNA adyacentes a dicho sitio, se puede identificar el sitio de inserción [De Block, 1993; Radhomony, *et al.* 2005].

Uno de los herbicidas utilizados para la selección de plantas transformadas es el glufosinato de amonio, conocido comercialmente como PESTANAL®, un potente inhibidor de la enzima glutamina sintetasa. Esta enzima es esencial para la asimilación de nitrógeno en las plantas y el gen de resistencia proviene de un glutaminosintetasa insensible al inhibidor que fue aislada de bacterias de género *Streptomyces* [Powles *et al.*, 1996].

3.5 Respuesta de *Arabidopsis thaliana* ante condiciones de estrés biológico y adaptaciones fisiológicas.

Un estrés biológico se define como una condición o fuerza adversa que inhibe el funcionamiento normal y el bienestar de un sistema biológico [Mahajan y Tuteja, 2005].

Una gran variedad de condiciones ambientales pueden inducir estrés, alterando significativamente el metabolismo, crecimiento y desarrollo de las plantas. Es importante entender las respuestas de las plantas a condiciones de estrés si se quiere mejorar el rendimiento de cultivo de vegetales bajo condiciones poco

favorables de crecimiento. Las plantas responden y se adaptan al estrés a nivel molecular, celular, fisiológico y bioquímico [Urano *et al.*, 2010].

Las plantas presentan respuestas para contrarrestar los efectos de las condiciones adversas que dificulten su supervivencia. Las condiciones de insuficiencia o exceso de Fósforo inducen respuestas adaptativas en diversas plantas que se traducen en cambios metabólicos, morfológicos y estructurales [Navarro, 2005].

3.5.1 Respuesta a alto fosfato.

La presencia de concentraciones elevadas de algún nutriente en los suelos puede conducir a alteraciones en la fisiología de las plantas [Rogato *et al.*, 2010]. Una sobre acumulación de nutrimento en los tejidos puede generar efectos negativos en las células además de limitar la absorción de otros nutrimentos por parte de la planta [Bubier *et al.*, 2011].

El Fósforo suele ser un nutriente escaso en los suelos naturales y raramente alcanzaría niveles tóxicos. Sin embargo, la excesiva aplicación de fertilizantes ha generado áreas en donde los suelos se encuentran saturados con Fósforo. Tal elevación provoca, a su vez, un fenómeno conocido como eutroficación que se caracteriza por crecimiento excesivo de ciertas algas que tienen efectos nocivos sobre ecosistemas acuáticos [Behrendt y Boekhold, 1993]

Las plantas de *A. thaliana* se ven afectadas en el transporte de fosfato a altas concentraciones de este mineral ya que se convierten en hiperacumuladoras de

fosfato y acusan claros síntomas de intoxicación. [Delhaize y Randall, 1995]. La deficiencia de zinc puede también causar una elevación en la toma de fosfato en las plantas, lo que conduce a síntomas de toxicidad por este mineral [Singh *et al.*, 1988]. El exceso de fosfato puede tener también efectos negativos sobre la absorción de micronutrientes, particularmente hierro [Zheng *et al.*, 2009].

3.5.2 Respuesta a deficiencia de fosfato.

Los cambios morfológicos que se han ido observando en estrecha asociación con la deficiencia de Fósforo, consisten principalmente en un incremento en el tamaño y grosor de sus raíces, formación de raíces proteoides [Navarro, 2005]. La habilidad de las plantas de adquirir fosfato aumenta significativamente cuando éstas se encuentran en deficiencia de Pi, este aumento es aparentemente regulado, en parte, a nivel transcripcional [Raghothama *et al.*, 2004].

Se han visto cambios bioquímicos asociados a la presencia de transportadores de mayor afinidad por fósforo del suelo [Raghothama, 2000] y entre los diferentes tejidos de la planta [Liu *et al.*, 1997]. También se ha observado la reducción en la circulación de Pi a través del floema cambios metabólicos posiblemente relacionados con un uso más eficiente de Pi [Rivera, 2004], movilización de Pi de la vacuola al citoplasma [Raghothama, 2000], secreción de ácidos orgánicos [Dinkelaker *et al.*, 1995], secreción de fosfatasas y RNAsas [Duff *et al.*, 1989] y, finalmente, alteraciones metabólicas de la respiración [Theodorou y Plaxton, 1993], del metabolismo del carbono [Farré *et al.*, 2000], de la fijación de nitrógeno

y de la síntesis de aminoácidos aromáticos. Todos estos cambios metabólicos se asocian a la activación de ciertos genes, al silenciamiento de otros y/o a los cambios en actividad enzimática por modificación postraducciona, aunque los cambios morfológicos suelen ser más evidentes, los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares no juegan un papel menos importante en la respuesta adaptativa de la planta y su papel en tal respuesta difícilmente puede separarse [Navarro, 2005].

La deficiencia de Pi rápidamente induce la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en transporte de Pi, llevando a un incremento en la transcripción y síntesis de fosfatasas ácidas tanto intracelulares como extracelulares. Se sabe que los niveles de ATP y de todos los nucleótidos disminuyen significativamente en cultivos celulares durante deficiencia de Pi y que el PPI, que se mantiene en altos niveles, por lo que podría funcionar como una fuente autónoma de energía. Las enzimas consideradas como adaptativas de la ruta de la glucólisis, aquellas que no requieren al Pi como sustrato, son activadas con condiciones de deficiencia de Pi, permitiendo que se lleve a cabo el metabolismo del carbono en estas condiciones [Plaxton, 1996].

4. HIPÓTESIS

Dado que la planta mutante $At\Delta PPa5$ (*A. thaliana* carente de la proteína PPasa, isoforma cinco) presenta un fenotipo alterado, su adaptación al estado nutrimental de Fósforo se alterará. Es decir, los cambios en la actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble que se observen en la planta silvestre, bajo los diferentes estados de nutrición, serán distintos a los que se presenten en la planta mutante, no sólo debido a la ausencia de la isoforma cinco, sino también por alteraciones en la actividad de las pirofosfatasas inorgánicas solubles restantes.

5. OBJETIVO

Determinar la actividad de pirofosfatasa en extractos de hojas de plantas de *A.thaliana* silvestre y de la mutante AtPPa5, ambas crecidas bajo condiciones control (Medio completo conteniendo 1 mM K_2HPO_4), bajo condiciones de inanición de Fósforo (Medio completo sin fosfato, con 1 mM K_2SO_4), o bajo condiciones de exceso de Fósforo (Medio completo conteniendo 2.5 mM K_2HPO_4).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Material y equipo de laboratorio

- Espectrofotómetro UV/VIS Optizen® POP Bio, de Mecasys Co., Ltd.
- Centrifuga para tubos eppendorf Biofugue pico de Heraeus®
- Lector de placas de Elisa Bio-Rad Benchmark®

6.1.2 Material Biológico

Las semillas de *A. thaliana* de la mutante con la inserción del tDNA, fueron adquiridas del *Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)*, de la universidad de Ohio, EUA, a través de la iniciativa TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*).

6.1.3 Disoluciones

La composición de las disoluciones empleadas en este trabajo se indica en las tablas 1 a la 16, que se muestran a continuación.

Tabla 1.- Concentración de nutrientes para medios de control y tratamiento con estrés por inanición o alto fosfato.

COMPUESTOS	(nM)		
	Control	Alto Fosfato	Sin Fosfato
Sulfato de amonio	1.014	1.014	1.014
Ácido bórico	0.049	0.049	0.049
Cloruro de calcio	1.020	1.020	1.020
Cloruro de cobalto (II)	1.08x10 ⁴	1.08x10 ⁴	1.08x10 ⁴
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	0.020	0.020	0.020
EDTA sal de sodio dihidratada	0.100	0.100	0.100
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.100	0.100	0.100
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.749	0.749	0.749
Sulfato de manganeso hidratado	0.059	0.059	0.059
Molibdato de sodio dihidratado	0.001	0.001	0.001
Ioduro de potasio	0.005	0.005	0.005
Nitrato de potasio	24.728	24.728	24.728
Fosfato monobásico de potasio	1.087	2.500	0.000
Sulfato de zinc heptahidratado	0.007	0.007	0.007
Sulfato de potasio	0.000	0.000	1.000

Tabla 2.- Amortiguador de extracción de proteína

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (mM)
Tris-HCl	100
EDTA	1
MgCl ₂	3
pH 7.5	

Se agregó una pastilla de inhibidores de proteasas Complete (Roche Molecular Biochemicals. Mannheim Germany) por cada 50 mL.

Tabla 3.- Amortiguador de elución A

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (mM)
Tris-HCl	100
EDTA	1
MgCl ₂	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
pH 7.5	

Tabla 4.- Amortiguador de elución B

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (mM)
Tris-HCl	100
EDTA	1
MgCl₂	3

pH 7.5

Tabla 5.- Amortiguador de elución C

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN
Tris-HCl	100 mM
EDTA	1 mM
MgCl₂	3 mM
Etilenglicol	50 %

pH 7.5

Tabla 6.- Amortiguador para medir actividad pirofosfatasa con Magnesio.

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (mM)
Tris-HCl	100
EDTA	0.1
MgCl ₂	3

pH 7.5

Tabla 7.- Amortiguador para medir actividad pirofosfatasa sin Magnesio.

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (mM)
Tris-HCl	100
EDTA	0.1

Tabla 8.- Reactivo de trabajo verde de Malaquita

	COMPUESTO	mL
Reactivo 1	Verde de malaquita 0.45 % (v/v) en HCl 2 N	2
Reactivo 2	Molibdato de amonio 6 N	1
Reactivo 3	Brij al 3 % saturado con NaCl	1
	Agua	9

Tabla 9.- Amortiguador de resuspensión de proteína

COMPUESTOS	CONCENTRACION
	mM
Tris-HCl	100
EDTA	1
MgCl ₂	3
(NH ₄) ₂ SO ₄	500

Tabla 10.- Amortiguador de carga para SDS-PAGE

COMPUESTOS	CONCENTRACION
Tris-HCl	0.125 M
SDS	4 %
Glicerol	20 %
DTT	0.2 M
Azul de bromofenol	0.02 %

pH 6.8

Tabla 11.- Concentración de soluciones para preparar un gel poliacrilamida

Solución	Gel concentrador	Gel separador
	4 %	12 %
Acrilamida 30 %, Bis-Acrilamida 0.8 %	4 mL	8 mL
Tris 1.5 M, pH 6.8	2.5 mL	-----
Tris 1.5 M, pH 8.8	-----	5 mL
TEMED	4 µL	8 µL
Persulfato de amonio 10 %	200 µL	400 µL
SDS 10 %	0.1 mL	0.2 mL
Agua	3.35 mL	6.7 mL

Tabla 12.- Solución de tinción de proteínas en gel

COMPUESTOS	CONCENTRACION (%)
Azul de coomassie R250	0.025
Metanol	40
Ácido acético	7

Tabla 13.- Solución sensibilizadora para tinción de proteínas en gel

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	
Tiosulfato de sodio	10 %	2 mL
Volumen final		1 L

Tabla 14.- Solución de plata para tinción de proteínas en gel

COMPUESTO	VOLUMEN
Nitrato de plata (1 N)	12.5 mL
Volumen final	1 L

Esta solución se prepara al momento de usarse.

Tabla 15.- Solución de desarrollo para tinción de proteínas en gel

COMPUESTOS	CONCENTRACION
Carbonato de potasio	30 g
Formaldehido (37 %)	250 μ L
Tiosulfato de sodio (1 N)	125 μ L
Volumen final	1 L

Tabla16.- Solución de paro para tinción de proteínas en gel

COMPUESTO	
Tris	40 g
Ácido acético	20 mL
Volumen final	1 L

6.2 Métodos

6.2.1 Preparación del medio de crecimiento.

Los medios se prepararon con los nutrientes listados en la Tabla 1 adicionando a cada uno 0.5 % p/v de sacarosa y MES 2.35 % p/v. Se ajustó el pH a 5.7 y se agregó 0.33 % p/v de Gellam Gum a la solución, adicionalmente a los medios para el crecimiento de las plantas mutantes se agregó a una concentración de 50 μ M Pestanal. Se vertió la solución en cajas Petri estériles y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

6.2.2 Germinación de semillas, crecimiento de plantas y selección de plantas mutantes

Las semillas de *A. thaliana* silvestre y de la mutante *At Δ PPa5*, se desinfectaron con una solución al 50 % de hipoclorito de sodio (cloro comercial) y 1 % de Triton X-100 por 10 min. Se enjuagaron exhaustivamente con agua desionizada y estéril hasta eliminar todo el residuo de detergente y cloro. Las semillas desinfectadas se colocaron con micropipeta en cajas Petri elaboradas previamente con los distintos medios de crecimiento (ver 6.2.1). Se sembraron 150 semillas de cada lote experimental.

La germinación de semillas se realizó por estratificación. Las cajas Petri con semillas se colocaron a 4 °C en ausencia de luz (se envuelven con papel aluminio)

por 48 horas. Terminado este periodo el papel aluminio se retiró y se transfirieron a una cámara de crecimiento a 22 °C con luz continua por un periodo de 4 a 6 horas (estimulando germinación). Se envolvieron en papel aluminio nuevamente y se colocaron a 22°C por 48 horas. Por último, se retira el papel aluminio y las semillas sembradas en las cajas Petri se colocaron verticalmente en una cámara de crecimiento a 22 °C con un fotoperiodo de 16/8 luz/oscuridad durante 15 días. Posteriormente, a las plantas mutantes se les asperjo con una solución de herbicida Pestanal (50 µM) para seleccionar las plantas resistentes ya que está aunada a la mutación. Las plantas se dejaron dos días más.

Al día 17 de crecimiento de las plantas WT y mutantes se cambiaron a frascos de boca ancha con los medios de tratamiento descritos anteriormente (ver tabla 6.2.1). Las plantas se dejaron en estos medios (control, sin y exceso de P) durante nueve días más.

6.2.3 Extracción de proteína.

Al término de la etapa de experimentación las plantas se molieron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino para después agregar el amortiguador de extracción (Tabla 2) y finalmente obtener una mezcla homogénea. Estas muestras se centrifugaron a 12000 x g por 10 min . Se descartó el precipitado y el sobrenadante se dividió en dos fracciones. A una de las fracciones (extracto crudo liofilizado) se le agregó glicerol estéril hasta completar el 10 % con respecto al volumen total de esta fracción. Posteriormente, se hicieron alícuotas de 200 µL

las cuales se liofilizaron hasta obtener un volumen de aproximadamente 20 μL . Se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis (ver 6.2.3). A la segunda fracción (extracto crudo fresco) se le cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (ver 6.2.4) y se le midió la actividad pirofosfatasa (ver 6.2.6).

6.2.4 Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Esta cuantificación se realizó al extracto crudo fresco en un análisis a micro escala en placas de Elisa multipozo con 2 μL de muestra y 150 μL de reactivo de Bradford (Quick Start Bradford marca Biorad No. 500-0205). La curva estándar se realiza con albumina bovina sérica (BSA) como proteína patrón con una concentración desde 0 a 12 μg .

6.2.5 Fraccionamiento de actividad de la pirofosfatasa en columna de fenilsefarosa.

La columna de fenilsefarosa se equilibró con, al menos cinco veces su volumen con amortiguador de elución A (Tabla 3). Se eluyen los 20 μL de proteína (ver 6.2.3) que se disolvieron previamente en 200 μL de amortiguador de elución A (Tabla 3). Se eluye con 10 mL de amortiguador de elución A (Tabla 3), seguidos de 10 mL de amortiguador de elución B (Tabla 4) y, finalmente, 10 mL de amortiguador C (Tabla 5). Las fracciones se colectan en volúmenes de 1 mL.

6.2.6 Medición de actividad de pirofosfatasa.

Se colocan 25 μL de las fracciones que se obtuvieron en la sección 6.2.5 en dos placas multipozo tipo Elisa, una placa debe contener 25 μL del amortiguador para medir actividad pirofosfatasa con Magnesio (Tabla 6) y la otra placa 25 μL de amortiguador para medir actividad pirofosfatasa sin Magnesio (Tabla 7). La reacción se detiene con 200 μL de reactivo verde de Malaquita (Tabla 8) después de 30 min .

La placa se lee a 595 nm en un lector de placas de Elisa Bio-Rad Benchmark, con una curva estándar de 0 a 20 nm de pirofosfato para dar un volumen total de 50 μL por cada pozo.

6.2.7 Medición de absorbencias de las fracciones

A las fracciones que se obtuvieron en la sección 6.2.6 se les midió la absorbencia a 280 nm en el Espectrofotómetro UV/VIS Optizen® usando como blanco los amortiguador de elución utilizados para el fraccionamiento (Tablas 3, 4 y 5).

6.2.8 Desalado de fracciones.

Las fracciones que se obtuvieron en la sección 6.2.5 que presentaron una actividad pirofosfatasa más alta, se desalaron en una columna de Sephadex G-25 Superfine®.

Las fracciones se precipitaron con acetona-TCA al 10%. Se utilizó un volumen de muestra por cinco volúmenes de acetona-TCA. Las muestras se dejaron precipitando por una noche a 4° C. Posteriormente, se centrifugaron cinco minutos a 5000 rpm a 4 °C, conservando el precipitado. De nuevo, se agregó acetona fría y se centrifugó 5 min a 5000 rpm a 4 °C. Éste último paso se repitió una vez más. Al precipitado final se le agregó el amortiguador de carga (Tabla 10) y se cargó en el gel de electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).

6.2.9 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).

Para realizar la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) se prepararan los geles según lo descrito en la Tabla 6.11, las muestras se suspenden en el amortiguador de carga (Tabla 10) y se carga el gel y se corre a 70 mV

6.2.10 Tinción de geles con nitrato de plata.

Los geles se cubrieron con la solución de tinción (Tabla 12) durante 30 min y se enjuagaron con agua durante 10 min y se repitió la operación tres veces. Para sensibilizar el gel se cubrió con Solución sensibilizadora (Tabla 13) durante 1 min y se enjuagó con agua dos veces durante 1 min, enseguida se sumergió con Solución de plata (Tabla 14) por 30 min y se enjuago con agua de 5 a 15 seg. El gel se sumergió en solución de desarrollo (Tabla 15) de 10 a 20 min y se detuvo el

desarrollo del color con la solución de paro (Tabla 16) al sumergir de 30 a 60 min para finalizar la tinción se enjuagó varias veces con agua desionizada.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1.- Selección de las plantas mutantes At Δ PPa5

Las plantas mutantes At Δ PPa5 fueron seleccionadas con PESTANAL® puesto que la mutación está ligada a la resistencia a este herbicida. Esta selección se hizo toda vez que las plantas tenían 15 días de crecimiento, esto fue para no estresarlas en etapas más jóvenes en donde la planta está estableciendo su metabolismo de plántula a planta joven. Cuando se seleccionaron las plantas resistentes al herbicida se obtuvieron las plantas mutadas en el gen de interés.

En un reporte en nuestro laboratorio se mostró que la mutante At Δ PPa5 tiene un fenotipo distinto respecto a la planta wt (Fig. 3 y 4) [Villafranca, 2011]. En el presente trabajo se corroboró lo observado anteriormente, en el crecimiento en condiciones control conforme pasa el tiempo aumenta la cantidad de hojas de menor tamaño en la roseta de la mutante At Δ PPa5, fenómeno que no sucede en la planta silvestre donde las hojas de la roseta tienden a aumentar su tamaño a medida que la planta se desarrolla (Fig. 3). En lo referente al sistema reproductivo, la mutante At Δ PPa5 mostró un notable incremento en el número de tallos florales, flores vainas y semillas (Fig. 4). La planta control presento hojas más grandes y con tendencia a aumentar de tamaño.

Fenotipo de las plantas wt y At Δ PPa5 bajo deficiencia de fosfato

Control wt (Semana 3)	Mutante At Δ PPa5 (Semana 3)
--------------------------	--



Fig. 3.- Fenotipo de las plantas wt y mutante At Δ ppA5 en el tratamiento por deficiencia de fosfato.

Fotografías tomadas al termino de cada semana durante 3 semanas.

Fenotipo de las plantas wt y At Δ PPa5 bajo deficiencia de fosfato

Control wt (Semana 3)	Mutante At Δ PPa5 (Semana 3)
--------------------------	--



Fig. 4.- Fenotipo de las plantas wt y mutante At Δ PPa5 en tratamiento por alto fosfato. Fotografías

tomadas al termino de cada semana durante 3 semanas.

Al ser sometidas a los diferentes tratamientos a estrés se pudieron observar claras diferencias. En el tratamiento de estrés por alta concentración en Fosfato la planta control wt se le observó un tono ligeramente amarillo al terminar el tratamiento hojas ligeramente alargadas, brillo y tamaño superior al del tratamiento con deficiencia de Fosfato; en las raíces se observó un incremento en la longitud y densidad, así como la proliferación de raíces secundarias, y en la planta mutante *AtΔPPa5* el color es más uniforme durante este tratamiento. En el tratamiento de estrés por deficiencia de fosfato desde la primera semana se observa que ambas plantas tienen tejidos dañados, observando un color amarillento y algunas hojas cloróticas, lo que se hace más patente conforme pasa el tiempo, aunque ambas crecen y desarrollan tallos floral a pesar de estos cambios.

7.2.- Cuantificación de la concentración de proteína en el extracto crudo fresco de las plantas *A. thaliana* bajo los diferentes tratamientos

En la Tabla 17 se puede observar los resultados obtenidos luego de la extracción de proteína (Ver 6.2.3) de *A. thaliana* y la cuantificación de la concentración de proteína que se realizó por el método de Bradford (Ver 6.2.4). De acuerdo a la concentración de proteína en los extractos crudos (Tabla 17) se pudo detectar una mayor cantidad de proteína en las plantas mutantes que en la planta wt en condiciones control e incluso en las plantas crecidas en deficiencia de Pi en el medio, lo que se refleja un menor contenido de proteína por gramo de tejido, es

decir que aunque bajo deficiencia de Pi, ambas plantas crecieron poco, la mutante At Δ PPa5 estaba menos afectada.

Tabla 17. Concentración de proteína en los extractos crudos de plantas de *A. thaliana* bajo diferentes tratamientos

Muestra	Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Wt Control	0.585
Wt Menos fosfato	0.197
Wt Alto fosfato	0.606
AtΔPPa5 Control	0.357
AtΔPPa5 Menos fosfato	0.531
AtΔPPa5 Alto fosfato	0.661

La planta wt crecida en condiciones de bajo Pi es la que presenta una menor concentración de proteína con respecto a las otras, en la planta mutante crecida en esta misma condición se observa un aumento en la concentración aun mayor que la condición control. Es necesario enfatizar que, aunque la planta carece de una isoforma de pirofosfatasa, ésta crece con mayor cantidad de hojas arrojadas e incluso se ve menos afectada cuando se crece en deficiencia de Pi que la planta control.

7.3.- Cuantificación de la actividad proteínica pirofosfatasa en el extracto crudo fresco de las plantas *A. thaliana* bajo los diferentes tratamientos.

Se midió la actividad pirofosfatasa total en los extractos crudos de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos, se observaron cambios importantes en la condición de deficiencia de Pi. En la Tabla 18 se observa que la actividad de la pirofosfatasa no se modifica en la planta wt cuando se pone un exceso de Pi en el medio, al igual que la planta mutante bajo esta condición. Aún más interesante es que la actividad pirofosfatasa se ve aumentada en la planta control cuando se mantiene en condiciones de crecimiento deficiente de Pi, mientras que la planta mutante *AtΔPPa5* tiene una disminución muy notable al respectivo control. Esta misma tendencia de actividad se mantiene cuando se considera la concentración de los diferentes extractos crudos (Tabla 19).

Tabla 18. Actividad de pirofosfatasa del extracto crudo de *A. thaliana* wt y la planta mutante *AtΔPPa5* bajo diferentes tratamientos.

Muestra	Actividad pirofosfatasa (nM de P . $\mu\text{g}_{\text{tejido fresco}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
Wt Control	6.8
Wt menos fosfato	12.2
Wt alto fosfato	5.9
AtΔPPa5 Control	8.3
AtΔPPa5 Menos fosfato	3.8
AtΔPPa5 Alto fosfato	10.1

Tabla 19. Actividad específica de pirofosfatasa del extracto crudo de *A. thaliana* wt y la planta mutante At Δ PPa5 bajo diferentes tratamientos.

Muestra	Actividad específica de pirofosfatasa (nM de P . $\mu\text{g}_{\text{Proteína}}^{-1}$. min^{-1})
Wt Control	0.145
Wt menos fosfato	0.776
Wt alto fosfato	0.122
At Δ PPa5 Control	0.291
At Δ PPa5 Menos fosfato	0.089
At Δ PPa5 Alto fosfato	0.191

7.4.- Fraccionamiento en columna de los diferentes tratamientos para las plantas *A. thaliana* wt y la mutante At Δ PPa5.

Al realizar el fraccionamiento en columna se buscó conocer y observar la variabilidad que presenta la expresión de las diferentes isoformas de la pirofosfatasa de *A. thaliana* y ver el comportamiento que presentan las plantas cuando son sometidas a condiciones de estrés. Se evaluaron todos los resultados y se presentan aquí los datos para las distintas condiciones a los que se sometieron las plantas.

En la Figura 5 se puede observar que los extractos crudos de las plantas de *A. thaliana* silvestres pueden fraccionarse en cuatro picos de actividad. El primero

eluye en presencia de sal, dos más eluyen cuando se retira la sal del lavado y el último cuando se añade etilenglicol (50 %) al medio de elución. El ancho de los picos sugiere que podrían contener más de un componente, especialmente el último que eluye con 50 % de etilenglicol.

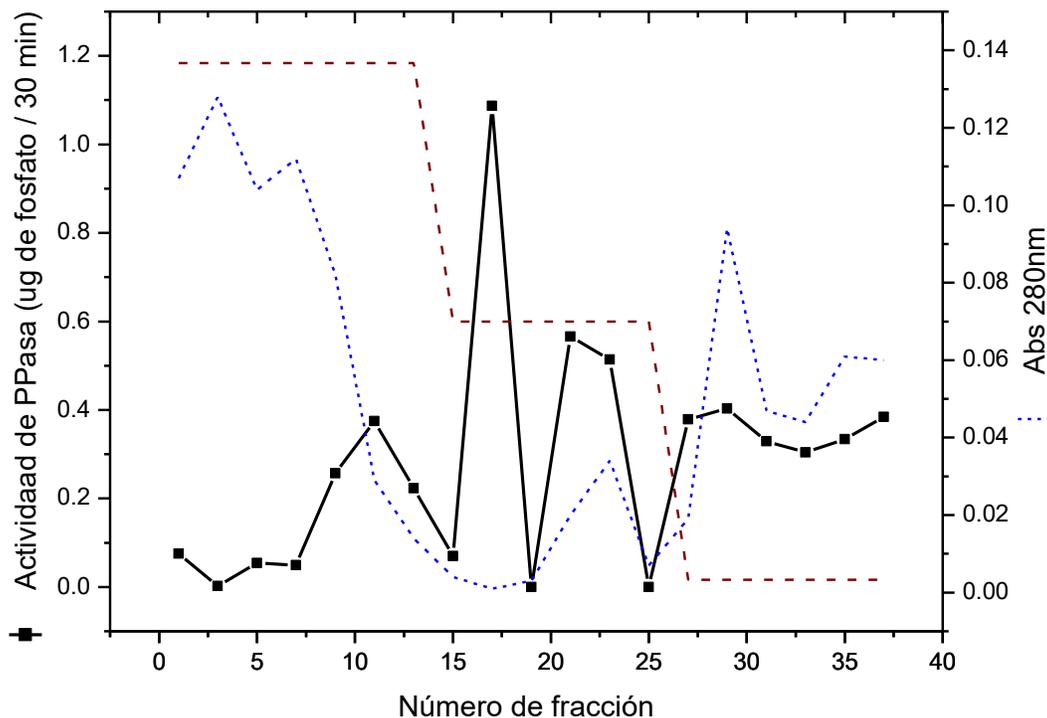


Figura 5.-Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas silvestres de *A. thaliana* crecidas en condiciones control. Las isoformas fueron separadas en columnas de fenilsefarosa, como se indica en métodos. La línea punteada azul muestra la concentración de proteína, la línea continua negra con diamantes la actividad pirofosfatasa (como μg de fosfato producidos en 30 min) y la línea punteada vino el cambio de medio de elución (ver métodos).

Las absorbencias de las fracciones se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm dado que la mayoría de las proteínas absorben a esta longitud de onda. Se puede observar que en la figura 5 el primer pico de concentración de proteína (línea punteada azul) es alto pero no observa actividad pirofosfatasa de igual tamaño, entonces podemos decir que aunque existe muchas proteínas, la presencia de pirofosfatasas activas es insuficiente.

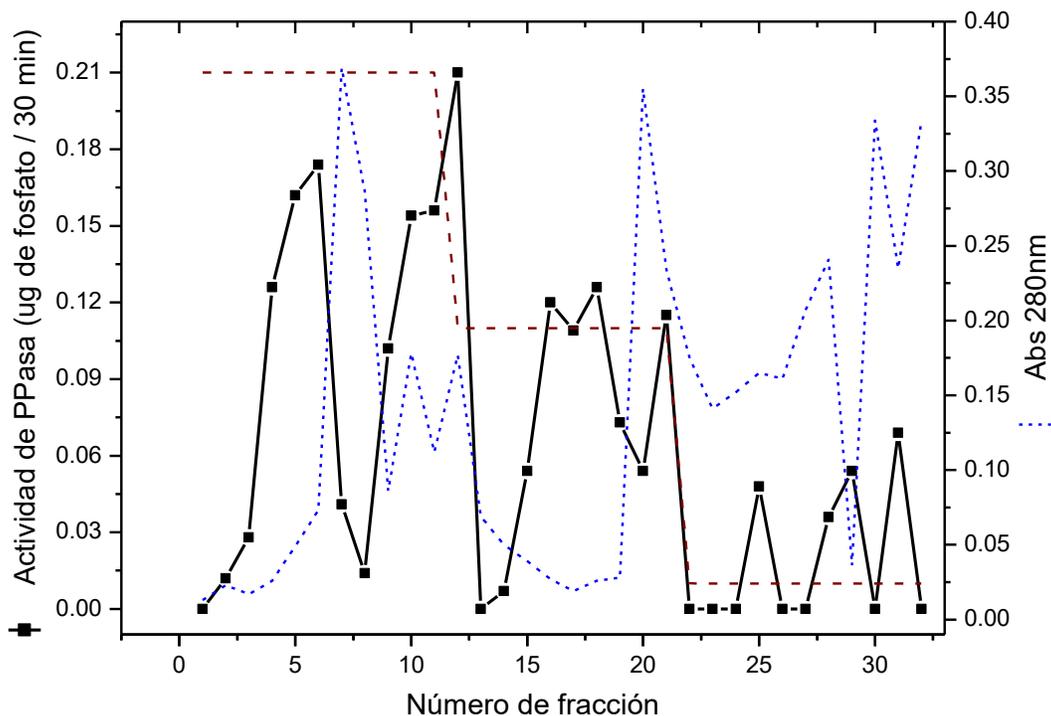


Figura 6.-Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas silvestres de *A. thaliana* crecidas en condiciones de exceso de fosfato. Las isoformas fueron separadas en columnas de fenilsefaroasa, como se indica en métodos. La línea punteada azul muestra la proteína, la línea continua negra con diamantes la actividad pirofosfatasa (como μg de fosfato producidos en 30 min) y la línea punteada vino el cambio de medio de elución (ver métodos).

La Figura 6 representa el perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente del Mg en la planta wt crecida en condiciones de exceso de fosfato, se observa que hay nuevamente cuatro picos de actividad. El primero nuevamente eluye en presencia de la sal, la segunda entre el intercambio de los cambios de amortiguador, el tercero en ausencia de sal y el último pico cuando se añadió el etilenglicol. En este caso los picos eluidos en presencia de sal (1 y 2), son de

mayor tamaño, mientras que el último pico, eluído con etilenglicol se subdivide en dos picos más pequeños. Aunque no sabemos qué isoforma de pirofosfatasas corresponde a cada pico o incluso si algunos picos son debidos a proteínas con modificaciones postraduccionales, es claro que la planta está adaptando su metabolismo de fósforo a la condición de crecimiento.

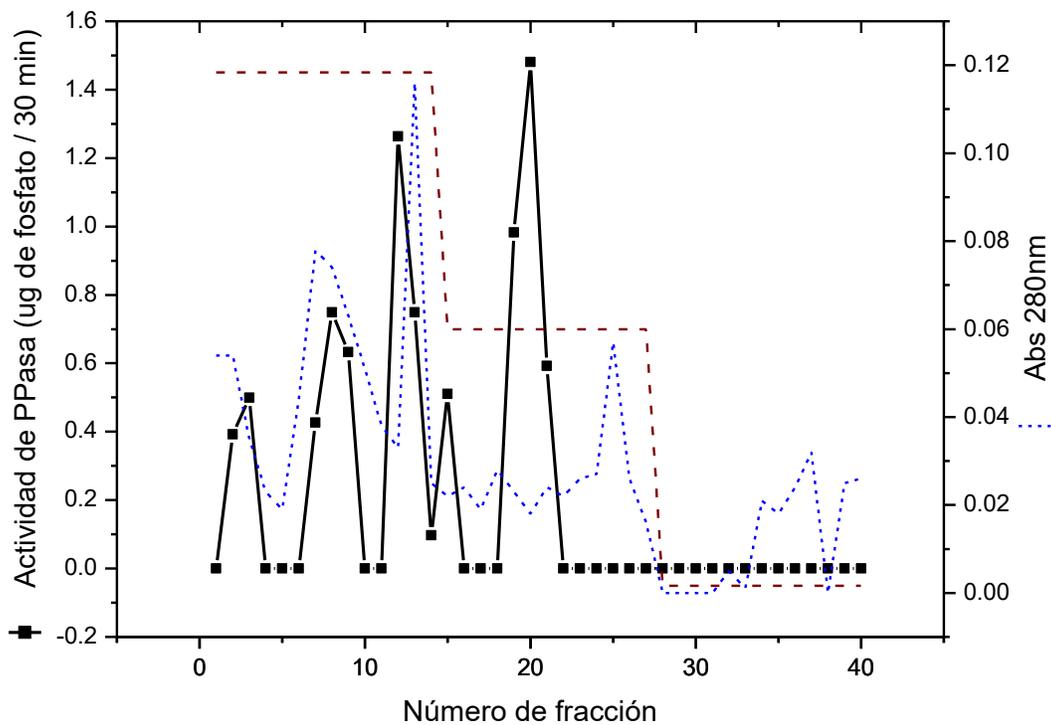


Figura 7.-Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas silvestres de *A. thaliana* crecidas en condiciones de bajo fósforo. Las isoformas fueron separadas en columnas de fenilsefariosa, como se indica en métodos. La línea punteada azul muestra la proteína, la línea continua negra con diamantes la actividad pirofosfatasa (como µg de fosfato producidos en 30 min) y la línea punteada vino el cambio de medio de elución (ver métodos).

En la Figura 7 se puede observar el perfil de actividad de la PPasa de la planta wt crecida en condiciones de bajo fosfato que podemos comparar con las dos figuras anteriores (5 y 6). Sin embargo, los dos primeros se observan en las primeras fracciones (elución con sal) y son mucho mayores que en el control. El tercero presenta un hombro y parece coincidir con el pico 2 del perfil control juntos, mientras que el tercero y cuarto parecen ser equivalentes al tercer pico control subdividido. No se detectó actividad en las últimas fracciones eluidas con etilenglicol.

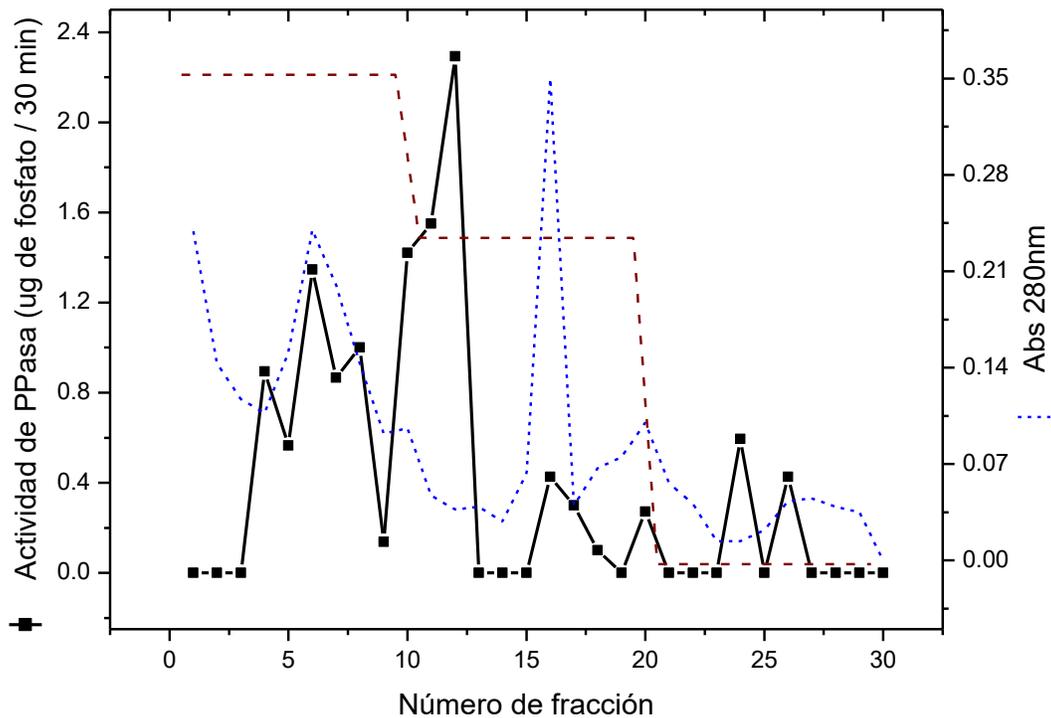


Figura 8.- Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas mutantes *AtΔPPa5* de *A. thaliana* crecidas en condiciones control. Las isoformas fueron separadas en columnas de fenilsefarosa, como se indica en métodos. La línea punteada azul muestra la proteína, la línea continua negra con diamantes la actividad pirofosfatasa (como μg de fosfato producidos en 30 min) y la línea punteada vino el cambio de medio de elución (ver métodos).

En la Figura 8 se observa el fraccionamiento en columna de las plantas mutantes *AtΔPPa5* crecidas en condiciones control. Se observa un perfil semejante en distribución de picos al de la figura 5, pero el tamaño del pico 1 en el control es considerablemente menor quedando ambos picos subdivididos en dos cada uno. Aparentemente la pérdida de una isoforma puede ser compensada por la planta

con la mayor expresión de otras isoformas, lo que se refleja en un cambio en el tamaño de los picos, si bien la distribución del perfil es muy parecida.

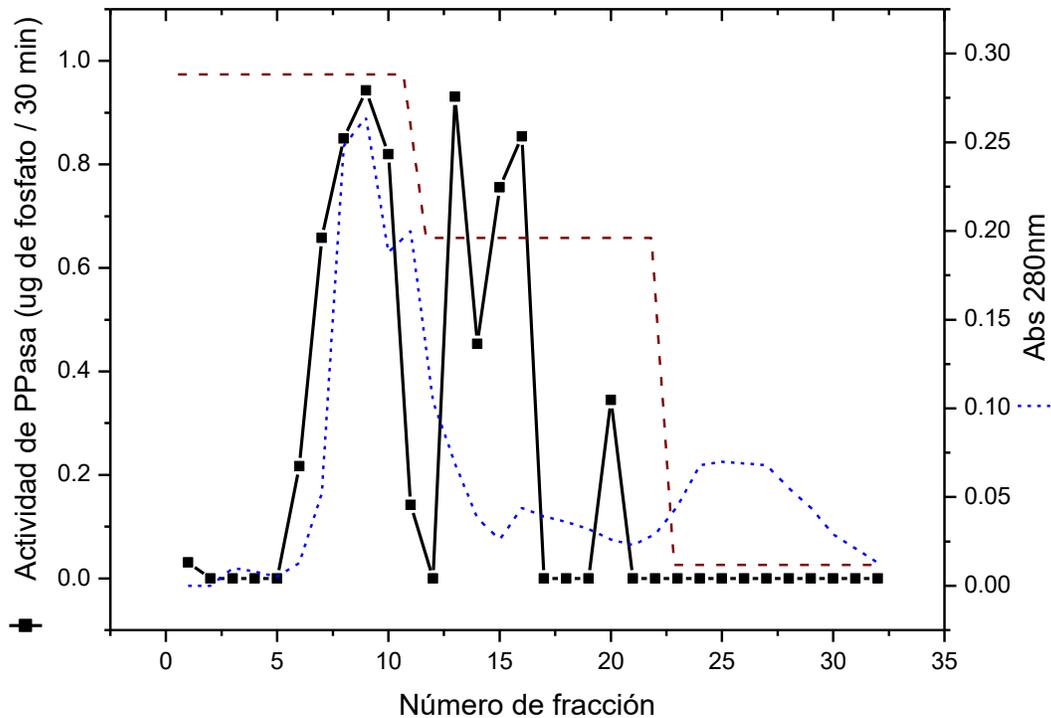


Figura 9.- Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas mutantes *AtΔPPa5* de *A. thaliana* crecidas en condiciones de alto fosfato. Las isoformas fueron separadas en columnas de fenilsefariosa, como se indica en métodos. La línea punteada azul muestra la proteína, la línea continua negra con diamantes la actividad pirofosfatasa (como µg de fosfato producidos en 30 min) y la línea vino el cambio de medio de elución (ver métodos).

En la Figura 9 podemos ver el perfil de actividad que se generó con la plantas At Δ PPa5 crecidas bajo condiciones de alto fosfato, pero a diferencia del perfil de la figura 5 en este caso los picos de actividad que eluyen con sal y luego de retirar la sal son mucho mayores. Esta referencia correlaciona con una apariencia mas uniforme y con menor senescencia de las hojas, bajo esta condición de estrés, en comparación con la planta silvestre. Como se mencionó en los antecedentes, la actividad de estas enzimas es necesaria para impulsar la biosíntesis y, por lo tanto, un mejor establecimiento de los tejidos.

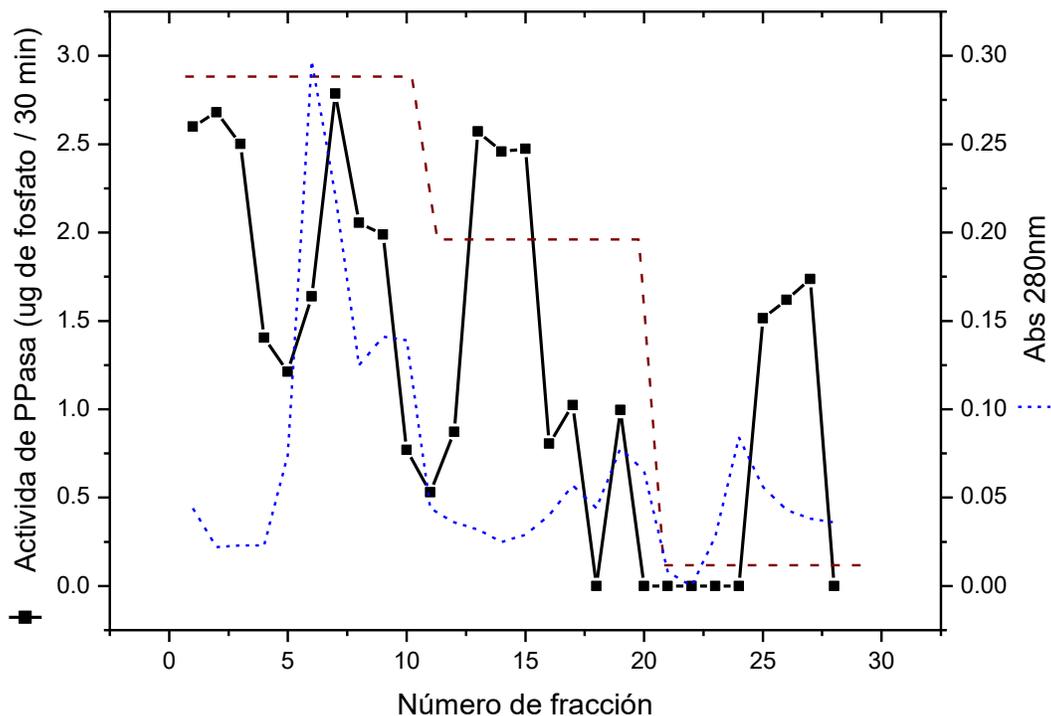


Figura 10.-Perfil de actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble, dependiente de Mg en los extractos crudos de plantas mutantes *AtΔPPa* de *A. thaliana* crecidas en condiciones de bajo fosfato. Las isoformas fueron separadas en columnas de fenilsefaroasa, como se indica en métodos. La línea punteada azul muestra la proteína, la línea continua con diamantes la actividad pirofosfatasa (como μg de fosfato producidos en 30 min) y la línea punteada vino el cambio de medio de elución (ver métodos).

En la Figura 10 se observan 3 picos de actividad pirofosfatasa, cada uno de ellos se eluye en seguida de los cambios de medios, que a diferencia de los perfiles de actividad para las plantas *AtΔPPa5* crecidas en condiciones de exceso y control (Figura 8 y 9) en el cambio del medio a etilenglicol la actividad es nula o muy bajo con respecto a los otros cambios de medio que se hacen el en fraccionamiento en columna. Resulta notorio que este perfil se parece al de la planta control bajo

suficiencia de fósforo (Fig. 5), a pesar que tanto la mutante como la planta silvestre redujeron su crecimiento y mostraron marchitamiento de las hojas bajo la condición de deficiencia de fósforo.

En los perfiles de fraccionamiento de la actividad pirofosfatasa se observa que la planta mutante carece del último pico de actividad (en el gradiente de etilenglicol) en comparación con la planta wt en condiciones control (Fig. 5) o en presencia de exceso de fosfato (Fig. 6). En estos perfiles hay también concordancia de la presencia de un solo pico de actividad cuando se eluye la columna de fenilsefarosa con sulfato de amonio en la mutante con el perfil de la planta wt en condiciones control. En términos generales, este primer pico de actividad está presente en todos los perfiles y sólo se ve modificado en su tamaño en las diferentes condiciones.

Con respecto al pico de actividad del perfil de separación cuando se elimina la fuerza iónica del medio de elución en la columna de fenilsefarosa (línea punteada vino segundo escalón) en todos los tratamientos con exceso o disminución de fosfato (Figuras 6, 7, 9 y 10) se observan muy disminuidos, en comparación con lo observado bajo condiciones control en la planta mutante y en la wt (Figuras 5 y 8). Esto pudiera significar que esta isoforma de pirofosfatasa que se logra despegar de la columna disminuyendo la fuerza iónica (segundo escalón de la línea punteada vino en las Figuras 6, 7, 9 y 10) de fosfato en el medio de crecimiento. Por último y muy interesante, es el último pico de actividad que se obtiene del fraccionamiento de la actividad esta isoforma que se despega cuando

se cambia la hidrofobicidad del medio de elución con etilenglicol (tercer escalón de la línea punteada color vino en las Figuras 5, 6, 7, 8, 9 y 10).

En la planta wt control (Fig. 5) hay presencia de un pico de proteína muy definido con actividad pirofosfatasa, sin embargo, este pico se pierde en la misma planta crecida en aumento o deficiencia de Pi (Figuras 6 y 7) pero se sigue observando este pico en la mutante con escasos de fosfato (Fig. 10). Esto nos sugiere que esta actividad pirofosfatasa no se ve afectada en la planta mutante aun cuando hay baja disponibilidad de fosfato. Hay que recordar que las plantas presentan seis isoformas de pirofosfatasa, cuatro de las cuales se expresan en el citoplasma de manera constitutiva [Navarro, 2009]. La ausencia de una de ellas ejerce una respuesta adaptativa a la disponibilidad de fosfato en el medio de crecimiento de la planta. Además, podemos decir que la ausencia de esta isoforma tiene un papel importante en la planta que pudiera ser reemplazable por las demás isoformas al modificar los niveles de actividad en cada una de ellas. Desafortunadamente, la identificación de las isoformas que dan lugar a cada pico de actividad no ha sido posible aún, a pesar de varios esfuerzos realizados en el laboratorio, lo cual dificulta proponer una explicación relacionando la expresión de las proteínas con actividad pirofosfatasa con los cambios observados en actividad. La complejidad de tener seis isoformas complica mucho el análisis, porque además podrían estar sujetas a modificación postraduccional, por ejemplo fosforilación, como medida de regulación de su actividad.

7.5.- Geles de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) para los máximos de actividad del fraccionamiento en columna de los distintos tratamientos para las plantas *A. thaliana* wt y la mutante *AtΔPPa5*.

Los geles de SDS-PAGE nos permitieron caracterizar y asegurar que las proteínas que se obtuvieron son realmente PPasa. El peso molecular de las proteínas de PPasa de *A.thaliana* es de alrededor de 25 kD.

En los geles solamente se cargaron las fracciones correspondientes a los máximos de actividad mostrados en los distintos tratamientos por estrés y control para las plantas wt y las *AtΔPPa5* (Fig. 6, 5, 8 y 9). Se juntaron los mayores picos de actividad de los distintos perfiles para cargarlos al gel de electroforesis.

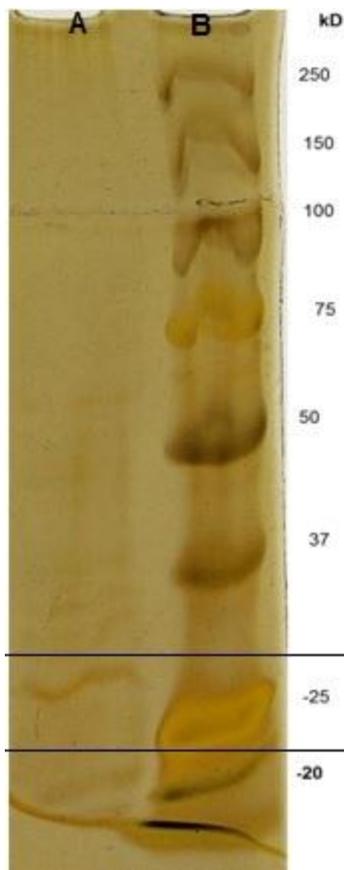


Figura 11.-Perfil electroforético de proteínas de plantas wt crecidas en condiciones control. Fracciones 16, 21 y 23 (ver materiales y métodos 6.2.5, Fig. 5); carril A. Marcadores de peso molecular; carril B.

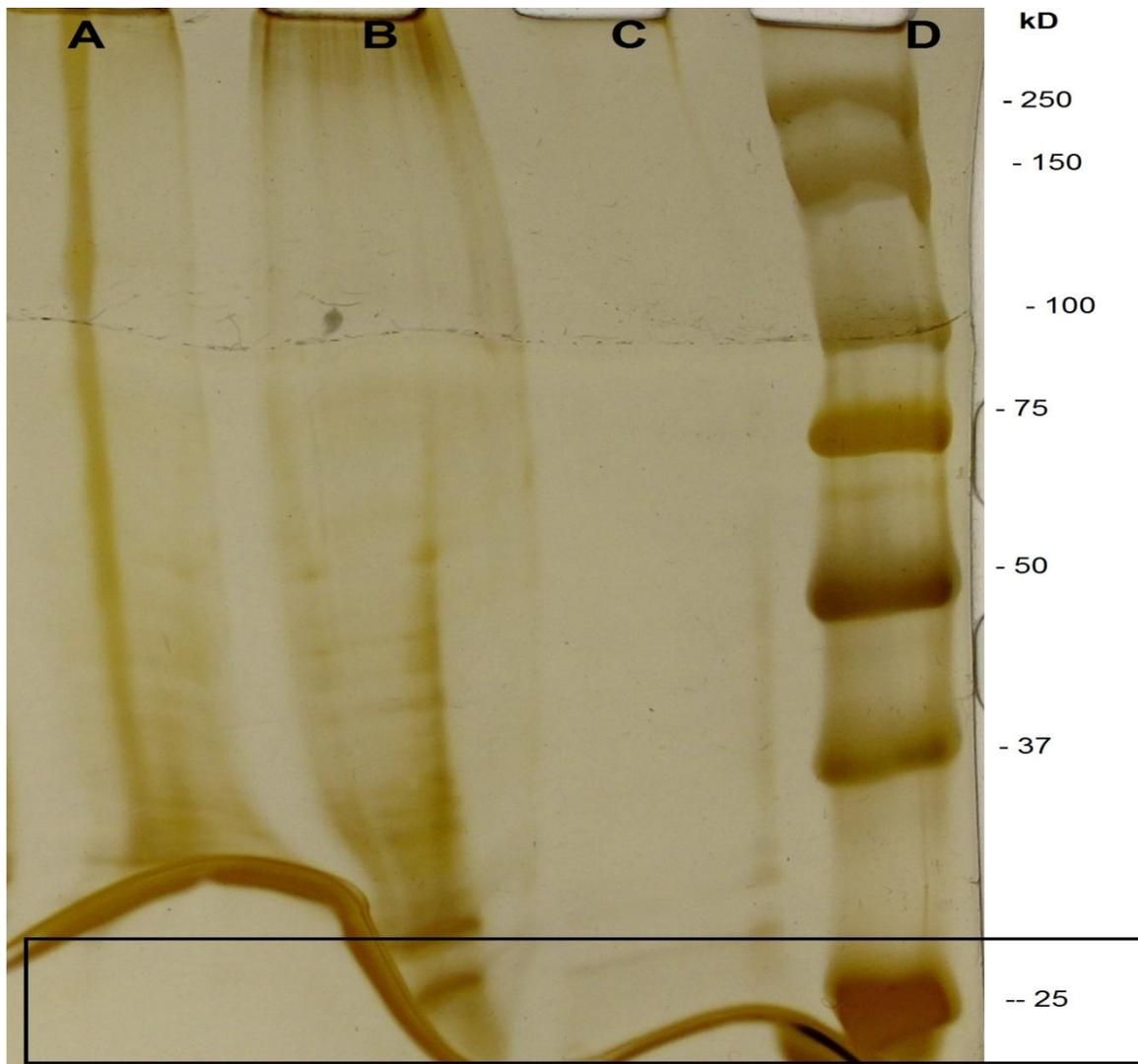


Figura 12. Perfil electroforético de plantas wt crecidas en condiciones de alto fosfato. Fracciones 6, 10 y 11, carril A; fracciones 12, 16 y 18, carril B; fracciones 25, 29 y 31, carril C (ver materiales y métodos 6.2.5, Fig. 6) y marcadores de peso molecular, carril D.

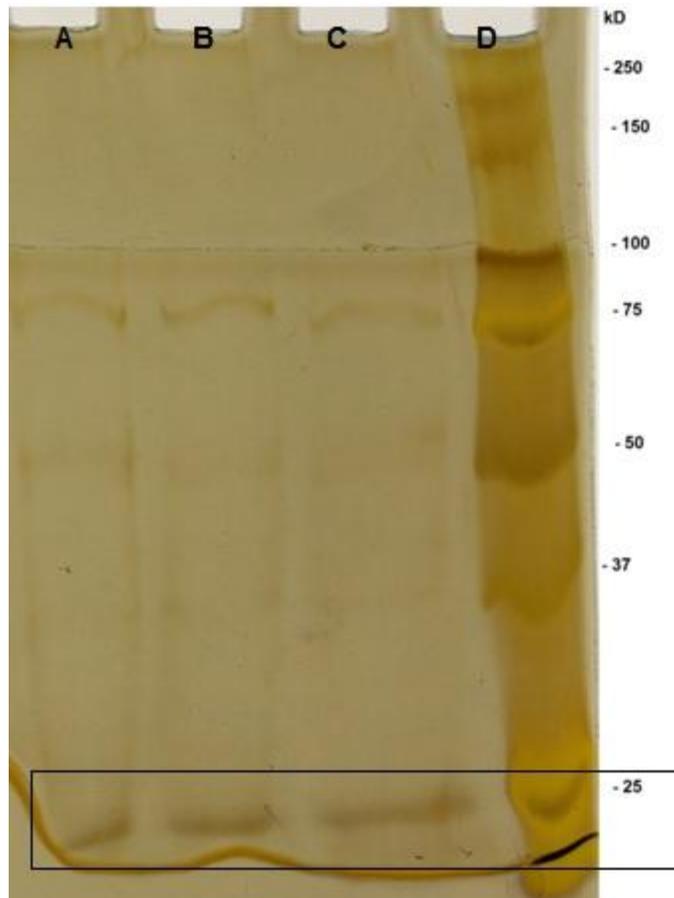


Figura 13.- Perfil electroforético de plantasmutantes *AtΔPPa5* crecidas en condiciones control. Fracciones 6, 7, y 8, carril A; fracciones 16, 17 y 20, carril B; fracciones 24 y 26 carril C (ver materiales y métodos 6.2.5, Fig. 8); y marcadores de peso molecular, carril D.

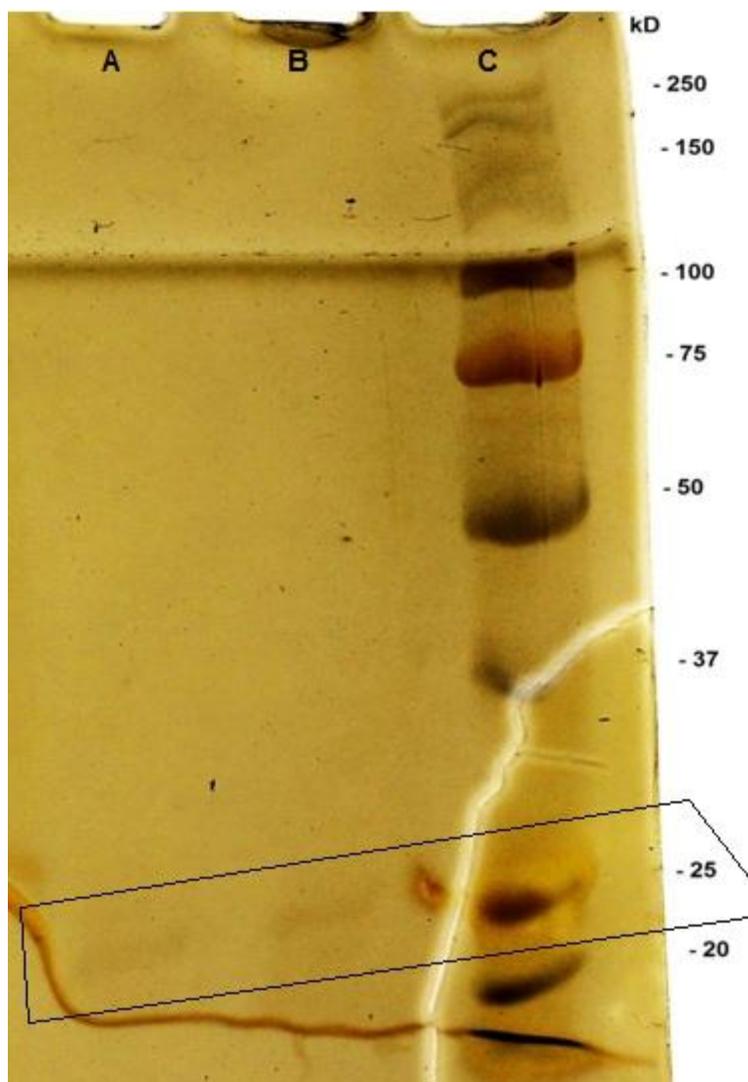


Figura 14.- Perfil electroforético de plantas mutantes *AtΔPPa5* crecidas en condiciones de alto fosfato. Fracciones 8, 9 y 10, carril A; fracciones 13, 15 y 16, carril B (ver materiales y métodos 6.2.5, Fig. 9); y marcadores de peso molecular, carril C.

8. CONCLUSIONES

A pesar de tener cinco isogenes que codifican para enzimas con actividad de pirofosfatasa inorgánica soluble en el citosol, la ausencia de la proteína At Δ PPa5 no puede ser compensada por completo en la planta, lo que sugiere que este isoforma tiene un papel propio no redundante. Esta isoforma parece ser importante en la respuesta a estrés por deficiencia de Fósforo, ya que la planta silvestre (wt) y la mutante no se comportan igual ante este estrés.

La actividad de las iPPasas son fundamentales para los seres vivos, pero lo observado en este análisis es que la ausencia de un gen que codifique para una de estas enzimas no es letal para la planta, por lo que podría decirse que la actividad de esta isoenzima puede ser substituida, en su papel principal, aunque la planta puede sobrevivir con la falta de alguna isoenzima, esto provoca que la planta realice cambios en su estructura fisiología y se genera una respuesta adaptativa, que bajo condiciones de exceso de fósforo, parece resultar benéfica.

El que la planta tenga cinco isoenzimas no se explica solo por mera redundancia de genes, pensar que cada una de ellas tiene una actividad específica dentro de la planta.

9. PERSPECTIVAS

El trabajo revela una serie de alteraciones en el comportamiento fisiológico de la planta cuando el gen de la isoforma 5 de la pirofosfatasa inorgánica soluble es suprimido y se ofrece un análisis a nivel bioquímico de la actividad de pirofosfatasa que revela cambios compensatorios en el perfil de actividad de este grupo de enzimas, que se manifiestan en la mutante nula bajo condiciones control, pero sobretodo bajo estrés por inanición de fósforo.

María José de Villafranca Casas (2011) realizó un análisis a nivel transcriptómico que revelo cambios extensos en la transcripción en las plantas mutantes en comparación con el control. Sin embargo, dichos cambios no necesariamente se reflejaran en cambios en la proteoma, por lo que un estudio de los cambios en el proteoma de estas mutantes en condiciones control y bajo deficiencia de fósforo está pendiente.

Adicionalmente, es posible que los cambios observados en el crecimiento tengan relación con cambios en la planta mutante relacionados en la producción o la sensibilidad a fitorreguladores como auxinas, brasinoesteroides y citocininas. En particular, entre los cambios observados por de Villafranca Casas (2011) se encontraban varias transcritos que codifican para las proteínas relacionadas con la respuesta auxinas y con senescencia. En este sentido la sensibilidad a auxinas, brasinoesteroides, metil jasmonato y/o citocinas es un aspecto pendiente de investigar en esta mutante.

Además una de las vías metabólicas que, por su nivel de actividad, contribuye más a la generación de pirofosfato es la síntesis de dí, tri, oligo y polisacáridos, como sacarosa, fructonas, sacarosa y almidón.

Así, en relación con la planta de *A. thaliana* silvestre, la ausencia de la isoforma 5 de pirofosfatasa en la mutante podría repercutir en cambios en el contenido de azúcares, disacáridos y almidón en la hojas (tejido fotosintético y fuente de azúcares para toda la planta) y/o los tejidos llamados de demanda (raíz, flores y fruto), lo cual es un aspecto pendiente de explorar, a fin de entender mejor el papel de la isoforma 5 de pirofosfatasa inorgánica soluble en *A. thaliana*.

Finalmente *A. thaliana* es una planta modelo que no posee utilidad agrícola, por lo que sería de sumo interés extender este estudio a otras plantas de interés agronómico, tales como frijol, maíz, trigo, chile, etc. Para determinar si existe en estas especies una proteína con funciones equivalentes a la isoforma 5 de pirofosfatasa de *A. thaliana* y, en su caso, investigar los efectos que tiene la manipulación de la expresión de dicha proteína.

10. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alonso J. M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D. K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom M., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseeuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C., Ecker J.R. 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science, New Series*, 301 (5633):653-657.
- Behrendt H., Boekhold A. 1993. Phosphorus saturation in soils and groundwaters. *Land degradation & Development* 4:223-243.
- Bubier J. I., Smith R., Juutinen S, Moore T. R., Minocha R., Long S., Minocha S. 2011. Effects of nutrient addition on leaf chemistry, morphology, and photosynthetic capacity of three bog shrubs. *Oecologia* 167:355-368.
- Cloud, S. J., y Bent, A. F. 1998. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16:735-743.
- Coello, C.P. L. 2001. Respuesta de las plantas a la deficiencia de Fosfato Avances en Bioquímica y Biología Molecular de plantas. Departamento de Bioquímica. Facultad de Química. UNAM. Pp:43-54.
- Cooperman B. S., Baykov A. A., Lahti R. 1992. Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends in Biochemical Science* 17: 262-266.
- Cori G.T., Ochoa S., Slein M.W., Cori C.F. 1951. The Metabolism of fructose in Liver. Isolation of Fructose-1-phosphate and Inorganic Pyrophosphate. *Biochimica et Biophysica Acta*; 7:304-317.
- Dancer J., Veith R., Feil R., Komor E., Stitt M. 1990. Independent Changes of Inorganic Pyrophosphate and the ATP/ADP or UTP/UDP ratios in planta cell suspension cultures. *Plant Science* 66:59-63.

-
- De Block M. 1993. The cell biology of plant transformation: Current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica* 71:1-14.
 - Delhaize E., Randall P. J. 1995. Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 107(1):207-213.
 - Dinkelaker B., Hengeter C., Marschener H. 1995. "Distribution and function of proteoid roots and other root clusters". *Botanica Acta* 108, 183-200.
 - Duff S.M. G.; Muorhead G.B. G., Lefebure D. D., Plaxton W. C. 1989. Phosphate starvation inducible "by Pases" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology* 90:1275-1278.
 - Farré E. M., Geigenberger P., Willmitzer L., Trethewey N. 2000. A possible role for pyrophosphate in the coordination of cytosolic and plastidial carbon metabolism within the potato tuber. *Plant Physiology* 123:681-688.
 - Gaxiola R. A., Edwards M., Elser J. J. 2011. A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops as part of comprehensive strategy for sustainable agriculture. *Chemosphere*. In Press; doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.062.
 - Gaytán Mondragón, Samantha A. 2013. La pirofosfatasa inorgánica soluble de cloroplastos de plantas superiores: estudio cinético y modelado de su estructura. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.
 - Gómez García M. R., Losada M., Serrano A. 2006. A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. *Biochemical Journal* 395:211-221.
 - Heinonen, J. K. 2001. The Biological Role of Inorganic Pyrophosphate. Kluwer Academic Publishers. Boston, U.S.A. pp 615-626.
 - Holford I. C. R. 1997. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research* 35:227-239.

-
- Horst W. J., Kamh M., Jibrin J. M., Chude V. O. 2001. Agronomic measures for increasing P availability to crops. *Plant and Soil* 237:211-223.
 - Kochian Leo V. 2000. Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport and utilization. In *Biochemistry and Molecular Biology of plants*, (B. Buchanan. W. Gruissem and R. Jones, eds.) pag 1223, cap 23. American Society of Plant Biologists.
 - Kôck M., May A., Berger S., Hertel T. 2010. The *Arabidopsis thaliana* phosphate starvation responsive gene *AtPPsPase1* encodes a novel type of inorganic pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1810:178-185.
 - Kornberg A. 1962. On the metabolic significance of Phosphorylic and Pyrophosphorylic Reactions. In *Kasha M and Pullman B, editions Horizons in biochemistry Academic Press NY*, pp 251-264.
 - Kornberg A., Rao N.N., Ault Riche P. 1999. Inorganic Polyphosphate: A molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* 68:89-125.
 - Kuhn Nicholas J., Ward Simon. 1998. Purification, properties and multiple forms of a Manganese activated Inorganic Pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 354:1; 47-56.
 - Lara-Núñez, A.; Chávez-Montes, R.; Hernández-Domínguez, E. y Rodríguez-Sotres, R. 2001. Participación del carbón en las semillas de cereales durante la fase de llenado. *Avances en Bioquímica y Biología Molecular de plantas. Departamento de Bioquímica. Facultad de Química UNAM*. pp. 147-164.
 - Liu C., Muchal U. S., Raghothama K. G. 1997. Differential expression of TPSII, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Molecular Biology* 33:867-74.
 - Lynch J. 1998. The role of nutrient-efficient crops in modern agriculture. *J. Crop Production* 1: 241-264.
 - Maeshima M., Nakanishi Y., Matsuura-Endo C. 1996. Proton pumps of the vacuolar membrana in growing plants cells. *Journal of plant Research* 109: 119-125.

-
- Mahajan S., Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139-158.
 - Mansurova S. E. 1989. Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 977:237-247.
 - Mitsuda N., Enami K., Nakata M., Takeyasu K., Sato N. H. 2001. Novel type *Arabidopsis thaliana* H⁺-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett*; 488:29-33.
 - Navarro de la Sancha E. 2005. Identificación y caracterización de genes de pirofosfatasa posiblemente implicados en respuesta a la deficiencia de Fósforo. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
 - Navarro de la Sancha E., Coello Coutiño M. P., Valencia Turcotte L., Hernández Domínguez E, Rodríguez Sotres R. 2007. Characterization of two soluble inorganic pyrophosphatases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*. 172. 796-807.
 - Navarro de la Sancha E. 2009. Localización intracelular de algunas isoenzimas de pirofosfatasa en plantas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. UNAM, Cd. Universitaria, D.F.
 - Perales Baños L. R. 2008. Caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* y su respuesta a condiciones de estrés. *Tesis de Licenciatura*. México D.F. Facultad de Química. UNAM.
 - Plaxton, W. C. 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:185-214.
 - Powles S. B., Preston C., Bryan I. B., Jutsum A. R. 1996. Herbicide Resistance: Impact and Management. *Advances in Agronomy* 58:57-93.
 - Radhamony R. N., Prasad A. M., Srinivasan R. 2005. T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology* 8 (1):82-106.
 - Raghothama, K. G. 1999. Phosphate Acquisition. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 50:665-93.

-
- Raghothama, K. G. 2000. Phosphate transport and signaling. *Current Opinion in Plant biology* 3:182-187.
 - Raghothama K.G., Karthikeyan A. S. 2004. Phosphate acquisition. *Plant and Soil* 274:37-49.
 - Raven P. H., Evert R. F., Eichhron S. E. 1999. *Biology of Plants*. Worth Publishers. New York.
 - Rivera Sánchez J. C. 2004. Movilización de fosfato y recambio de RNA en la germinación de frijoles sensibles y tolerantes a deficiencia de fosfato. Tesis de Licenciatura Facultad de Química. UNAM.
 - Rogato A., D'apuzzo E., Chiurazzi M. 2010. The multiple plant response to high ammonium conditions: The Lotus japonicus AMT1 3 protein acts as a putative receptor. *Plant Signal & Behavior* 5:2815-2826.
 - Rycher A.M., Randall D.D. 1994. The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiology Plantarum* 91:383-388.
 - Schachtman D. P., Reid R. J., Ayling S. M. 1998. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology* 116:447-453.
 - Schulze S., Mant A., Kossmann J., Lloyd J. R. 2004. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology*. 5:1594-1596.
 - Singh J., Karamanos R., Stewart J. 1988. The mechanism of phosphorus-induced zinc-deficiency in bean (*Phaseolus-vulgaris L.*). *Journal of Soil Science* 68:345-358.
 - Sivula A. S., Parfenyev A. N., Pekka P. 1999. Evolutionary aspects of inorganic pyrophosphatase. *FEBS Letters* 454:75-80.
 - Smith Frank W. 2000. The phosphate uptake mechanism. *Plant and soil* 245:105-114.
 - Stachel S. E, Nester E. W. 1986. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO Journal* 5: 390-395.

-
- Theodorou M. E, Plaxton W. C. 1993. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology* 101:339-344.
 - Urano K., Kurihara Y., Seki M., Shinosaki K. 2010. “Omics” analyses of regulatory networks in plant abiotic stress reponses. *Current Opinion in Plant Biology* 13:132-138.
 - Villafranca Casas M. J. de. 2011. Alteraciones en la expresión genética de mutantes de *Arabidopsisthaliana* como resultado de la deficiencia en un pirofosfatasa inorgánica soluble. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
 - Zheng L., Huang F., Narsai R., Wu J., Giraud E., He F., Cheng L., Wang F., Wu P., Whelan J., Shou H. 2009. Pysiological and Transcriptional Analysis of Iron and Phosphorus Interaction in Rice Seedling. *Plant Physiology* 151:262-274.
 - Zupupan J. R., Zambryski P. 1995. Transfer of t-DNA from *Agrobacterium* the Plant Cell. *Plant Physiology* 107:1041-1047.