

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la familia génica de las
nucleosidasas en *Phaseolus vulgaris***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Elena Delgado García

Directores

Gregorio Gálvez Valdivieso

Departamento Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal

Programa de doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Córdoba, 28 de abril de 2023

TITULO: *Caracterización de la familia génica de las nucleosidasas en Phaseolus vulgaris*

AUTOR: *Elena Delgado García*

© Edita: UCOPress. 2023
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>



TÍTULO DE LA TESIS: Caracterización de la familia génica de las nucleosidasas en *Phaseolus vulgaris*

DOCTORANDO/A: Elena Delgado García

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

El trabajo de Tesis Doctoral de Dña. Elena Delgado García se ha llevado a cabo en el Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal, en el grupo “Biotecnología de plantas superiores y algas verdes” (BIO-115). Durante la realización de la tesis, la doctoranda ha adquirido una amplia formación, ya que ha utilizado una gran variedad de técnicas propias de la Fisiología Vegetal, Bioquímica y Biología Molecular. La doctoranda ha mostrado un alto grado de compromiso en relación con el desarrollo de su tesis doctoral y una gran capacidad de trabajo. Asimismo, ha adquirido las competencias que la capacitan para afrontar con independencia proyectos de investigación en todo su espectro, desde el planteamiento de una hipótesis al diseño experimental o la interpretación de los resultados obtenidos. Por otro lado, también ha desarrollado las habilidades necesarias para difundir dichos resultados.

Parte de los resultados de este trabajo han sido ya publicados en la revista internacional *Frontiers in Plant Science* (Delgado García et al., 2021), revista situada en el primer decil del *Journal Citation Report*, en la categoría de *Plant Science*, así como en varios congresos nacionales e internacionales.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 27 de abril de 2023

Firma del director

GALVEZ
VALDIVIESO
GREGORIO -
30817106G

Firmado digitalmente
por GALVEZ VALDIVIESO
GREGORIO - 30817106G
Fecha: 2023.04.27
16:01:43 +02'00'

Fdo: Gregorio Gálvez Valdivieso

ABREVIATURAS

A	absorbancia
ATP	trifosfato de adenosina
BCIP	fosfato de 5-bromo4-cloro-4-indol
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DTT	1, 4-ditiotreitol
EDTA-Na	sal sódica del ácido etilendiamino tetraacético
<i>g</i>	aceleración de la gravedad
h	hora
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactósido
kb	kilobase
kDa	kilodalton
K_m	constante de Michaelis-Menten
LB	medio de Luria-Bertani (cultivo de microorganismos)
min	minuto
mM	milimolar
μ M	micromolar
OD	densidad óptica
ORF	<i>Open Reading frame</i> (marco abierto de lectura)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PF	peso fresco
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVPP	polovinilpolipirrolidona
P:v	peso:volumen
RNOS	especie reactiva de nitrógeno
ROS	especie reactiva de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
s	segundo
SDS	dodecil-sulfato sódico

TBE	tampón Tris-ácido bórico-EDTA
TEMED	N, N, N',N'-tetrametil etildiamina
Tris	tris(hidroximetil) aminometano
U	unidad internacional de actividad enzimática
V _{max}	velocidad máxima
V:v	volumen:volumen
X-gal	(5-bromo-4-cloro-3-indollil-β-D-galactopiranosido)

ÍNDICE

I. RESUMEN Y ABSTRACT	10
1. RESUMEN	12
2. ABSTRACT	14
II. INTRODUCCIÓN	16
1. EL CULTIVO DE LA JUDÍA Y SU IMPORTANCIA	18
2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS	20
3. METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS	22
4. PROCESOS FISIOLÓGICOS EN LOS QUE JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EL METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS	26
4.1. Nucleósidos como precursores de ureidos e importancia fisiológica de los ureidos .	26
4.2. Germinación y desarrollo posgerminativo	28
4.3. Nucleótidos como moléculas señalizadoras	32
4.3.1. cAMP y cGMP	32
4.3.2. Nucleótidos extracelulares	33
5. NUCLEÓSIDO HIDROLASAS EN PLANTAS	35
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
1. HIPÓTESIS	42
2. OBJETIVOS	43
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	44
1. REACTIVOS	46
1.1. SOLUCIONES	46
1.1.1. Solución para la purificación de ADN plasmídico	46
1.1.2. Solución de carga para electroforesis de ADN (6X)	46
1.1.3. Solución de carga para electroforesis de ARN (2X)	46
1.1.4. Soluciones para geles de poliacrilamida	46
1.1.5. Solución de revelado de inmunodetección	47
1.2. TAMPONES	47
1.2.1. Tampón TB (autoclavado)	47
1.2.2. Tampón TBE	47
1.2.3 Tampón electroforesis	47
1.2.4. Tampón de extracción de proteínas para ensayo enzimático	47
1.2.5. Tampón de carga Laemmli	48
1.2.6. Tampón TBS	48
1.2.7. Tampones para purificación de proteínas en columna NSFF	48
1.2.8. Tampón de infiltración de <i>N. benthamiana</i>	48

1.2.9. Tampones para purificación proteínas con StrepTactin-sepharose	48
1.2.10. Tampón de transferencia para inmunodetección	49
1.3. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS	49
1.3.1. Medio LB (Para medio LB sólidos, se añadió agar al 1,5 % (p:v)	49
1.3.2. Medio 2YT	49
1.3.3. Medio para <i>Rhizobium</i>	49
1.4. SOLUCIONES NUTRITIVAS PARA PLANTAS	50
1.4.1. Solución nutritiva H&P (modificada de Harper y Gibson, 1984)	50
1.4.2. Solución nutritiva B&D (Broughton and Dilworth, 1971)	50
1.5. ANTIBIÓTICOS	50
2. OLIGONUCLEÓTIDOS	51
3. MATERIAL BIOLÓGICO	52
3.1 ESTIRPES BACTERIANAS	52
3.3. MATERIAL VEGETAL	53
4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS	53
4.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS	53
4.2-CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS	53
5. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN	54
5.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i>	54
5.2. TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE CÉLULAS DE <i>E. COLI</i>	54
5.3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>AGROBACTERIUM</i>	54
5.4. TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN DE <i>AGROBACTERIUM</i>	55
6. CONDICIONES DE CULTIVO DEL MATERIAL VEGETAL	55
6.1. CONDICIONES DE CULTIVO DE JUDÍA	55
6.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	56
7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS	56
8. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	57
9. SECUENCIACIÓN	58
10. AISLAMIENTO Y SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE TEJIDOS DE JUDÍA	58
10.1. EXTRACCIÓN DE ARN	58
10.2. SÍNTESIS DE ADNc	59
10.2.1. Tratamiento con ADNasaI y síntesis de ADNc	59
10.3. FRACCIONAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS	60
10.3.1. Fraccionamiento de ADN	60

10.3.2. Fraccionamiento, cuantificación y determinación de la pureza e integridad del ARN	60
11. DIGESTIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.....	60
12. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN O VECTORES PLASMÍDICOS.....	60
12.1. CLONACIÓN INDEPENDIENTE DE LIGASA (LIC)	61
13. AGROINFILTRACIÓN DE PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i>	61
14. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL	62
15. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS	62
15.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)	62
16. TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL	63
16.1. TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE	63
16.2. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA.....	63
17. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	63
18. IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN NUCLEOSIDASAS DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	65
19. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE <i>PVNSH1, 2 Y 3</i> EN <i>E. COLI</i>	65
19.1. CLONACIÓN DE <i>PVNSH1, 2 y 3</i> EN EL PLÁSMIDO PET30b(+)	65
19.2. CLONACIÓN DE <i>PVNSH3</i> EN PET-HIS6-SUMO-TEV	66
19.3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN NSH1-HIS, NSH2-HIS Y NSH3-HIS	67
19.4. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN HIS-SUMO-PVNSH3.....	67
19.5. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA NSFF.....	67
19.6. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN NSH1-HIS Y NSH2-HIS, NSH3-HIS Y HIS-SUMO-NSH3.....	68
19.7. REGENERACIÓN DE LA COLUMNA NSFF.....	68
20. PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS.....	68
21. EXPRESIÓN Y, PURIFICACIÓN DE <i>PVNSH 2, 3 Y 4</i> EN <i>N. BENTHAMIANA</i>	69
21.1. CLONACIÓN EN EL PLÁSMIDO PXCS-HASTREP	69
21.2. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN <i>PVNSH2-HASTREP, PVNSH3-HASTREP Y PVNSH4-HASTREP</i>	70
22. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ASOCIADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC/MS-MS).....	70
23. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NUCLEOSIDASA.....	71
24. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NUCLEASA	72
25. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MEDIANTE RT-PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR).....	73

26. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS	73
26.1 DETERMINACIÓN DE UREIDOS	73
26.2 ANÁLISIS DE NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA ASOCIADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS)	74
27. EXTRACCIÓN DE FLUIDO APOPLÁSTICO DE RADÍCULAS DE JUDÍA	76
28. OBTENCIÓN DE PLANTAS QUIMÉRICAS DE JUDÍA CON RAÍCES QUE PRESENTAN ALTERADA LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>PvNSH1</i>	77
28.1. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES BINARIOS PARA EL SILENCIAMIENTO DE <i>PvNSH1</i>	77
28.2. TRANSFORMACIÓN DE PLÁNTULAS DE JUDÍA Y GENERACIÓN DE RAÍCES TRANSFORMADAS	78
29. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS <i>PvNSH3</i> Y <i>PvNSH4</i>	79
V. RESULTADOS	82
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS <i>PvNSH1</i> Y <i>PvNSH2</i> DE JUDÍA	84
1.1. Clonación y caracterización de las secuencias de las nucleosidasas <i>PvNSH1</i> y <i>PvNSH2</i> de judía	86
1.2. Estudio de la región promotora de los genes <i>PvNSH1</i> y <i>PvNSH2</i>	89
1.3. Sobreexpresión, purificación y caracterización de <i>PvNSH1</i> y <i>PvNSH2</i>	89
1.4. Caracterización cinética de las nucleosidasas <i>PvNSH1</i> y <i>PvNSH2</i> de judía	98
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS <i>PvNSH3</i> Y <i>PvNSH4</i> DE JUDÍA	100
2.1. Clonación y caracterización de las secuencias de las nucleosidasas <i>PvNSH3</i> y <i>PvNSH4</i> de judía	102
2.2. Análisis de la región promotora de <i>PvNSH3</i> y <i>PvNSH4</i>	108
2.3. Sobreexpresión, purificación y caracterización de <i>PvNSH3</i> y <i>PvNSH4</i>	108
2.4. Localización subcelular de <i>PvNSH3</i> y <i>PvNSH4</i> mediante microscopía confocal	112
CAPÍTULO III. REGULACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS CITOSÓLICAS DE JUDÍA DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSGERMINATIVO	115
3.1-Estudio de las nucleosidasas citosólicas de judía en cotiledones durante la germinación y desarrollo posgerminativo	117
3.2. Estudio de las nucleosidasas citosólicas de judía en ejes embrionarios durante la germinación y desarrollo posgerminativo	119
3.3. Actividad nucleasa durante la germinación y desarrollo posgerminativo temprano	121
3.4. Acumulación de ureidos durante la germinación y desarrollo posgerminativo temprano	121
3.5. Contenido de nucleósidos y nucleobases durante la germinación y el desarrollo posgerminativo	122

CAPÍTULO IV. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS NUCLEOSIDASAS DE JUDÍA EN PLANTAS ADULTAS CULTIVADAS EN CONDICIONES DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	125
4.1- Regulación de las nucleosidasas de judía en plantas adultas en condiciones de fijación biológica de nitrógeno (FBN) y fertilizadas con nitrato	127
4.2. Estudio del papel de las nucleosidasas PvNSH1 y PvNSH2 en el metabolismo de ureidos en plantas cultivadas en condiciones de FBN.....	129
CAPÍTULO V. REGULACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS APOPLÁSTICAS DURANTE LA RESPUESTA A DISTINTOS ESTRESSES	133
5.1. Estudio de las nucleosidasas apoplásticas PvNSH3 y PvNSH4 en respuesta a diferentes hormonas y estreses.....	135
5.2. Validación del ensayo de actividad nucleosidasa apoplástica en extractos crudos	136
VI. DISCUSIÓN.....	138
1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS CITOSÓLICAS DE JUDÍA	140
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS APOPLÁSTICAS DE JUDÍA	143
3. REGULACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSGERMINATIVO TEMPRANO	145
4. PAPEL DE LAS NUCLEOSIDASAS DURANTE LA SÍNTESIS DE UREIDOS EN PLANTAS DE JUDÍA CULTIVADAS EN CONDICIONES DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	149
5. PAPEL DE LAS NUCLEOSIDASAS APOPLÁSTICAS EN LA RESPUESTA A DISTINTOS TIPOS DE ESTRESSES EN JUDÍA.....	151
VII. CONCLUSIONES.....	155
VIII. BIBLIOGRAFÍA	159

I. RESUMEN Y ABSTRACT

1. RESUMEN

Los nucleótidos son moléculas de vital importancia en todos los seres vivos, ya que, además de ser componentes esenciales de los ácidos nucleicos, participan en procesos bioenergéticos, forman parte de cofactores de enzimas y de segundos mensajeros, y son precursores para la síntesis de metabolitos primarios y secundarios.

En plantas, los nucleótidos de purina y de pirimidina pueden proceder de la síntesis *de novo*, el reciclado de nucleósidos y bases nitrogenadas o pueden absorberse directamente del suelo.

Como en la mayoría de animales y microorganismos, el catabolismo de pirimidinas en plantas conlleva la reducción de uracilo y timina hasta CO_2 , NH_3 y β -alanina o β -aminoisobutirato, respectivamente. En cuanto al catabolismo de purinas, las plantas pueden oxidarlas completamente y recuperar el nitrógeno presente en ellas, mientras que la mayoría de los animales no. Otra particularidad del metabolismo de purinas en plantas es su relevancia en las leguminosas ureídicas, ya que la nucleobase xantina es el precursor de los ureidos alantoína y alantoato, moléculas claves en el transporte y almacenamiento de nitrógeno en este grupo de leguminosas. Además, en los últimos años se ha sugerido una conexión importante entre el catabolismo de los ácidos nucleicos y nucleótidos y el de ureidos en distintos procesos en los que se produce una elevada movilización de nitrógeno.

Tanto las rutas de síntesis *de novo* como las de reciclaje de nucleótidos confluyen en la formación de nucleótidos monofosfato, que son los sustratos de las 5'-nucleotidasas, fosfatasas que catalizan el primer paso de la ruta de degradación. Un elemento clave en la ruta de degradación de purinas es la formación del nucleósido xantosina, ya que marca un punto de no retorno en la degradación de purinas, pues no puede ser reciclada. El siguiente paso en la ruta de degradación de purinas y pirimidinas lo catalizan las nucleosidasas (nucleósido hidrolasas, NSH), enzimas que hidrolizan los nucleósidos hasta la base nitrogenada y ribosa, y que se han postulado como enzimas clave en el control del equilibrio entre degradación y reciclaje de nucleótidos.

Las nucleosidasas también pueden jugar un papel importante en procesos de señalización, ya que para que el eATP, una molécula señalizadora extracelular, actúe de manera eficiente, debe de poder ser retirado del apoplasto una vez ejerza su función, lo que ocurre

por la acción concertada de apirinas y nucleotidasas y nucleosidasas extracelulares. Estas nucleosidasas también podrían participar en la recuperación de nucleósidos del suelo o los que son liberados cuando una célula se daña.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la caracterización de la familia génica de las nucleosidasas en la leguminosa ureídica *Phaseolus vulgaris*. Para ello, se han clonado los genes que codifican dichas enzimas en judía, lo que ha permitido determinar que dicha familia está formada por, al menos, cuatro genes, dos de localización citosólica (*PvNSH1* y *PvNSH2*) y dos de localización apoplástica (*PvNSH3* y *PvNSH4*). Además, los ORFs de dichos genes se han sobreexpresado en sistemas heterólogos, lo que ha posibilitado la purificación de las enzimas correspondientes y su posterior caracterización. *PvNSH1* presenta alta afinidad por nucleósidos de purina y pirimidina, mientras que *PvNSH2* parece más específica de purinas y, en particular, de xantosina. En cuanto a las nucleosidasas apoplásticas, *PvNSH4* es activa a pH ácido y utiliza, principalmente, inosina como sustrato, mientras que no se ha podido caracterizar la actividad de *PvNSH3*. Cabe destacar, que el análisis filogenético de las nucleosidasas apoplásticas sugiere que estas enzimas tienen un origen evolutivo relativamente reciente, ya que sólo se han identificado en algunos grupos de plantas, pero no en organismos pertenecientes a otros reinos.

Por otro lado, se ha investigado el papel fisiológico de las nucleosidasas en judía. Los resultados obtenidos muestran que *PvNSH1* y *PvNSH2* juegan un papel relevante durante la germinación y el desarrollo postgerminativo de judía, lo que resalta la importancia del metabolismo de nucleótidos en esta fase de desarrollo. Además, se ha puesto de manifiesto la importancia de estas enzimas en los nódulos de judía, en los que su expresión y actividad es muy elevada, aunque no se ha podido demostrar una relación entre sus niveles y los de ureidos ni en raíces ni en nódulos. En cuanto a las nucleosidasas con posible localización apoplástica, se ha demostrado esta ubicación celular y que *PvNSH4* podría estar implicada en situaciones de respuesta a estrés y, en concreto, en aquellas que están mediadas por la hormona metil jasmonato. Por otro lado, no se ha podido obtener información acerca de la función de *PvNSH3*, ya que se han detectado niveles de expresión muy reducidos y sin cambios significativos en ninguna de las situaciones estudiadas.

2. ABSTRACT

Nucleotides are molecules of vital importance in all living organisms, as they are not only essential components of nucleic acids, but also participate in bioenergetic processes, are core element of cofactors and second messengers and are precursors for the synthesis of primary and secondary metabolites.

In plants, purine and pyrimidine nucleotides can be originate from *de novo* synthesis, salvage of nucleosides and nucleobases or can be absorbed directly from the soil.

As in most animals and microorganisms, pyrimidine catabolism in plants involves the reduction of uracil and thymine to CO₂, NH₃ and β-alanine or β-aminoisobutyrate, respectively. Regarding purine catabolism, plants can completely oxidise purines and recover the nitrogen present in them, while most animals cannot. Another peculiarity of purine metabolism in plants is its relevance in ureidic legumes, since the nucleobase xanthine is the precursor of the ureides allantoin and allantoate, key molecules in the transport and storage of nitrogen in this group of legumes. Furthermore, in recent years, an important connection between the catabolism of nucleic acids and nucleotides and that of ureides has been suggested in different processes involving high nitrogen mobilisation.

Both the *de novo* synthesis and nucleotide salvage pathways converge in the formation of monophosphate nucleotides, which are the substrates of 5'-nucleotidases, phosphatases that catalyse the first step of the degradation pathway. A key element in the purine degradation pathway is the formation of the nucleoside xanthosine, as it marks a point of no return in purine degradation, because it cannot be recycled. The next step in purine and pyrimidine degradation pathways is catalysed by nucleosidases (nucleoside hydrolases, NSH), enzymes that hydrolyse nucleosides to the nucleobase and ribose, and which have been postulated as key enzymes in controlling the balance between nucleotide salvage and degradation.

Nucleosidases may also play an important role in signalling processes, since for eATP, an extracellular signalling molecule, to act efficiently, it must be removed from the apoplast after exerting its function, which is achieved by the concerted action of apyrases and nucleotidases and extracellular nucleosidases. These nucleosidases may also be involved in the recycling of nucleosides from the soil or those that are released from damaged cells.

The main objective of this work has been the characterisation of the gene family of nucleosidases in the ureidic legume *Phaseolus vulgaris*. For this purpose, the genes encoding these enzymes in common bean have been cloned, which has allowed us to determine that this family is formed by at least four genes, two located in the cytosol (*PvNSH1* and *PvNSH2*) and two located in the apoplast (*PvNSH3* and *PvNSH4*). In addition, the ORFs of these genes have been overexpressed in heterologous systems, which has allowed the purification of the corresponding enzymes and their subsequent characterisation. PvNSH1 has a high affinity for purine and pyrimidine nucleosides, whereas PvNSH2 appears to be more specific for purines and, in particular, for xanthosine. Regarding the apoplastic nucleosidases, PvNSH4 is active at acidic pH and uses mainly inosine as substrate, while the activity of PvNSH3 could not be characterised. It should be noted that the phylogenetic analysis of apoplastic nucleosidases suggests that these enzymes have a relatively recent evolutionary origin, as they have only been identified in some groups of plants, but not in organisms belonging to other kingdoms.

On the other hand, the physiological role of nucleosidases in common bean has been investigated. The results obtained show that PvNSH1 and PvNSH2 play a relevant role during germination and postgerminative development, which highlights the importance of nucleotide metabolism at this stage of plant development. Furthermore, the importance of these enzymes in common bean nodules has been demonstrated, in which their expression and activity are very high, although no relationship between their levels and those of ureides in either roots or nodules has been demonstrated. Regarding the nucleosidases with predicted apoplastic localisation, this cellular location has been demonstrated, and that PvNSH4 could be involved in the response to stress and, specifically, in those stresses mediated by the hormone methyl jasmonate. On the other hand, it has not been possible to gain information about the function of PvNSH3, as the levels of expression detected were very low and without significant changes in any of the situations studied.

II. INTRODUCCIÓN

1. EL CULTIVO DE LA JUDÍA Y SU IMPORTANCIA

La judía es uno de los cultivos más antiguos del Nuevo Mundo. Junto con el maíz y la yuca, han sido el alimento básico dominante en las altitudes bajas y medias de América durante milenios. Es un cultivo extremadamente diverso en términos de métodos de cultivo, usos, variedad de ambientes a los que se han adaptado y variabilidad morfológica. Se pueden cultivar desde el nivel del mar hasta los 3.000 m sobre el mismo, en monocultivo, en asociaciones o en rotaciones (Broughton et al., 2003). Actualmente, se cultiva en todo el mundo, aunque casi toda la producción se concentra en Asia (50 %), América (24 %) y África (25 %) (FAOSTAT, 2020), y es una de las leguminosas más importantes en términos de cantidad. Su producción mundial ronda las 27 Mt de judía seca y 23 Mt de judía verde (Gioia et al., 2019), lo que la sitúa en la tercera posición entre las leguminosas en importancia para la alimentación, solo por detrás de la soja (346,2 Mt) y el cacahuete (62,2 Mt), y la primera si se considera únicamente el consumo directo por el ser humano (Semba et al., 2021) (Figura 1). En cuanto a la superficie cultivada, esta supera los 35 Mha (Semba et al., 2021). Aunque la producción de soja y cacahuete gobiernan la producción de leguminosas, solo el 6 % aproximadamente de soja se utiliza como alimento directamente, principalmente en Asia (Organic and Non-GMO Forum, 2020) y el 50 % de cacahuete se procesa como aceite para cocinar.

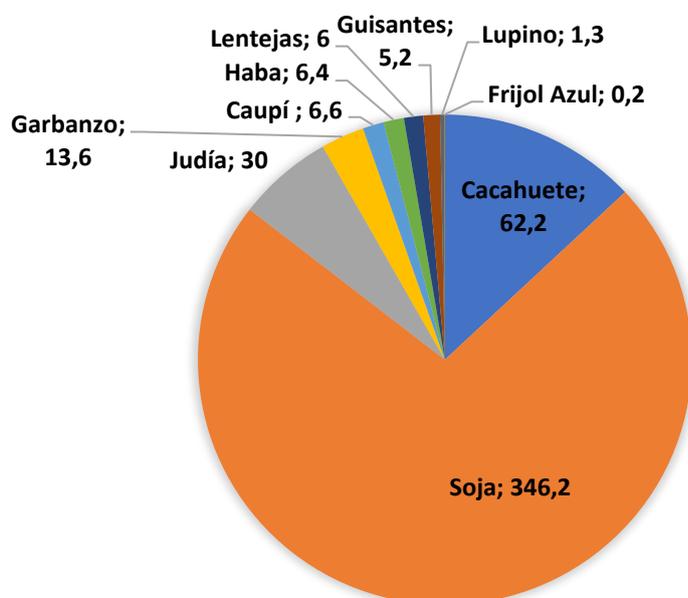


Figura 1. Contribución relativa de diferentes leguminosas en la producción global de legumbres. Las cantidades se muestran en millones de toneladas (FAOSTAT, 2020). (Adaptado de Semba et al., 2021).

La judía se consume tanto en grano seco como fresco, así como sus vainas frescas, y constituyen un alimento esencial para más de 500 millones de personas en países en vías de desarrollo, para los que supone un aporte de más del 50 % de la proteína ingerida (Broughton et al., 2003; Graham y Vance, 2003). Entre su composición nutricional destaca su alto contenido en proteína (20-25 % del peso total de la semilla), lo que supera al contenido proteico de las carnes (Semba et al., 2021), así como su alto contenido en hierro, fósforo y magnesio, de modo que 100 g de judía seca contienen el 21,6 %, 16 % y 14,4 % de la cantidad diaria recomendada de estos elementos, respectivamente (Broughton et al., 2003). Además, aportan fibra, carbohidratos complejos, vitaminas y otros fitoquímicos (Broughton et al., 2003).

La judía (*Phaseolus vulgaris* L.) es una planta diploide, con un genoma relativamente pequeño (650 Mpb) y una dotación cromosómica $2n=22$. A diferencia de otras leguminosas como la soja, presenta un genoma con un nivel relativamente bajo de duplicaciones cromosómicas y de regiones repetitivas, de modo que la mayoría de los locus son de copia única y las familias génicas tienden a ser pequeñas (Vallejos et al., 1992; Freyre et al., 1998; McClean et al., 2002).

La domesticación de *P. vulgaris* tuvo lugar dos veces, una en el área mesoamericana y otra en los Andes del sur (Bitocchi et al., 2012), tras la dispersión a larga distancia y la divergencia de especies ancestrales silvestres de judía en dichas áreas (Rendón-Anaya et al., 2017; Ariani et al., 2017). Como consecuencia, se establecieron dos acervos genéticos muy diferenciados que se caracterizan por la presencia de barreras geográficas y reproductivas parciales (Bitocchi et al., 2017). En las colecciones de judía, estos dos acervos genéticos están fuertemente diferenciados por caracteres morfológicos, bioquímicos (Singh et al., 1991), y por diferentes tipos de marcadores moleculares (McClean y Lee, 2007; Kwak y Gepts, 2009; Angioi et al., 2010; Bitocchi et al., 2012; Ariani et al., 2016). El acervo genético mesoamericano se caracteriza por presentar semillas pequeñas (< 0,25 g/semilla) o medianas (0,25-0,40 g/semilla), con patrones de faseolina de los tipos “S” o “B”, mientras que el acervo genético andino presenta semillas grandes (> 0,40 g/ semilla) con faseolina de los tipos “T”, “C”, “H” y “A” (Gepts y Bliss, 1986; Singh et al., 1991). Además, el acervo genético mesoamericano tiene mayor diversidad genética en comparación con el andino (Mamidi et al., 2013; Schmutz et al., 2014).

2. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS

El nitrógeno es el cuarto elemento en abundancia en las plantas y suele ser un elemento limitante en la mayoría de los ecosistemas terrestres (Cassman y Dobermann, 2022). Tiene un papel fundamental en los seres vivos, ya que forma parte de moléculas esenciales como nucleótidos, proteínas, clorofila, vitaminas, coenzimas y hormonas, entre otras. Su deficiencia en plantas causa reducción de la capacidad fotosintética, del crecimiento y la productividad, clorosis, senescencia y caída de hojas adultas, además de mayor susceptibilidad al ataque de patógenos o a distintos tipos de estreses abióticos (Salvagiotti et al., 2008; Nasser et al. 2008; Dordas y Sioulas 2009; Wang et al., 2012).

El 78% de la atmósfera está compuesta de N_2 , aunque este gran reservorio no puede ser empleado directamente por la mayor parte de organismos vivos debido a la presencia de un triple enlace que requiere cantidades enormes de energía para romperlo. La mayoría de las plantas utilizan fundamentalmente NO_3^- o NH_4^+ como fuente de nitrógeno (Bloom, 2015). La asimilación de NO_3^- conlleva su reducción a NH_4^+ y la incorporación de este a aminoácidos. Todo el NH_4^+ adquirido directamente del suelo o procedente de la reducción de NO_3^- se incorpora a través de la ruta GS/GOGAT (Bagh et al., 2004; Prinse y Espen 2015) Sin embargo, cuando el suelo es pobre en nitrógeno, algunas plantas, entre las que destacan las leguminosas, son capaces de reducir N_2 atmosférico gracias a la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de N_2 denominadas en su conjunto rizobios (Xu et al., 2012). Se estima que en el planeta se fijan unos 175 Mt de N_2 al año, de las cuales, las leguminosas fijan unas 80 Mt, mientras que buena parte de la otra mitad se fija industrialmente para sintetizar fertilizantes nitrogenados (Shan et al., 2021). Esta capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico de las leguminosas hace que sean plantas de gran interés (Stagnari et al., 2017). El cultivo de leguminosas también mejora el rendimiento de otros cultivos, ya que modifican la actividad de los organismos del suelo, las características químicas o físicas del suelo, y rompen los ciclos de enfermedades y plagas (Wani et al., 1995). Además, reduce la contaminación de ecosistemas, al permitir reducir la adición de fertilizantes químicos.

La interacción entre rizobio y leguminosa no es obligada, ya que ambos organismos pueden crecer en ausencia del otro. Por otro lado, esta interacción es específica; es decir, no todos los rizobios establecen simbiosis con todas las leguminosas. La judía establece asociaciones simbióticas fundamentalmente con *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli, *Rhizobium tropici* y *Rhizobium etli* (Shamseldin y Velazquez, 2020). En el

establecimiento de dicha simbiosis, la bacteria invade la raíz de la planta y se forma una estructura denominada nódulo, en cuyo interior los rizobios se diferencian y adquieren la capacidad de fijar N_2 . Estas nuevas formas reciben el nombre de bacteroides, los cuales poseen un complejo enzimático nitrogenasa, que es el responsable de la reducción del N_2 atmosférico mediante la reacción: $N_2 + 16ATP + 8e^- + 8H^+ \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$. Es un proceso muy costoso energéticamente, en el que la planta proporciona a los bacteroides carbono en forma de ácidos carboxílicos, principalmente malato, que estos utilizan como fuente de energía y esqueletos carbonados (Lodwig y Poole, 2003).

Los nódulos pueden ser de dos tipos: indeterminados o determinados. Los nódulos indeterminados son típicos de leguminosas de zonas templadas (guisante, alfalfa), tienen una morfología alargada, conservan una región meristemática en su extremo durante su madurez y sus células son infectadas continuamente. Por el contrario, los nódulos determinados son típicos de leguminosas tropicales o subtropicales (soja, judía, cacahuete), tiene una vida media muy definida y pierden su región meristemática central y su capacidad de ser infectados una vez alcanzada su madurez (Popp y Ott, 2011).

El NH_3 resultante de la fijación del nitrógeno en el bacteroide difunde a través de la membrana hasta el espacio peribacteroidal donde se protona a NH_4^+ y se exporta al citosol de la célula infectada (Udvardi y Poole, 2013). Una vez en el citosol, el NH_4^+ se asimila rápidamente a glutamina por acción de la glutamina sintasa (Lothier et al., 2011; Chungopast et al., 2014). La glutamina no suele ser el compuesto nitrogenado que se transporta a las partes aéreas, sino que se transforma en otras moléculas más propicias para su transporte (Peoples et al., 1985, 1987). Algunas leguminosas transportan el nitrógeno fijado en los nódulos en forma de amidas (principalmente asparragina), mientras que otras lo hacen en forma de ureidos (alantoína y alantoato), lo que permite clasificarlas en leguminosas amídicas y ureídicas. Las leguminosas amídicas como el guisante, el altramuz, *Medicago* y *Lotus* son típicas de climas templados, mientras que las ureídicas como la judía y la soja son típicas de climas tropicales o subtropicales (Atkins, 1991). No está claro el motivo por el que unas leguminosas transportan amidas y otras ureidos. Por un lado, si se tiene en cuenta la eficiencia en la utilización de carbono, los ureidos parecen ser moléculas más eficientes para el transporte de N, ya que tanto la alantoína como el alantoato presentan una relación N:C de 1:1, mientras que en la asparragina y la glutamina dicha relación es 1:2 y 1:2,5, respectivamente (Figura 2). Por otro lado, aunque la síntesis de ureidos es mucho más compleja que la de amidas (más de

20 reacciones enzimáticas frente a una), el gasto energético invertido en su síntesis resulta fácilmente recuperable ya que producen amonio o pueden actuar como donadores de grupos aminos en el metabolismo (Smith y Atkins, 2002). Además, los ureidos son menos solubles en agua que las amidas, lo que podría limitar su utilización en leguminosas en climas templados, mientras que no sería un inconveniente en climas tropicales (Sprenst, 1980).

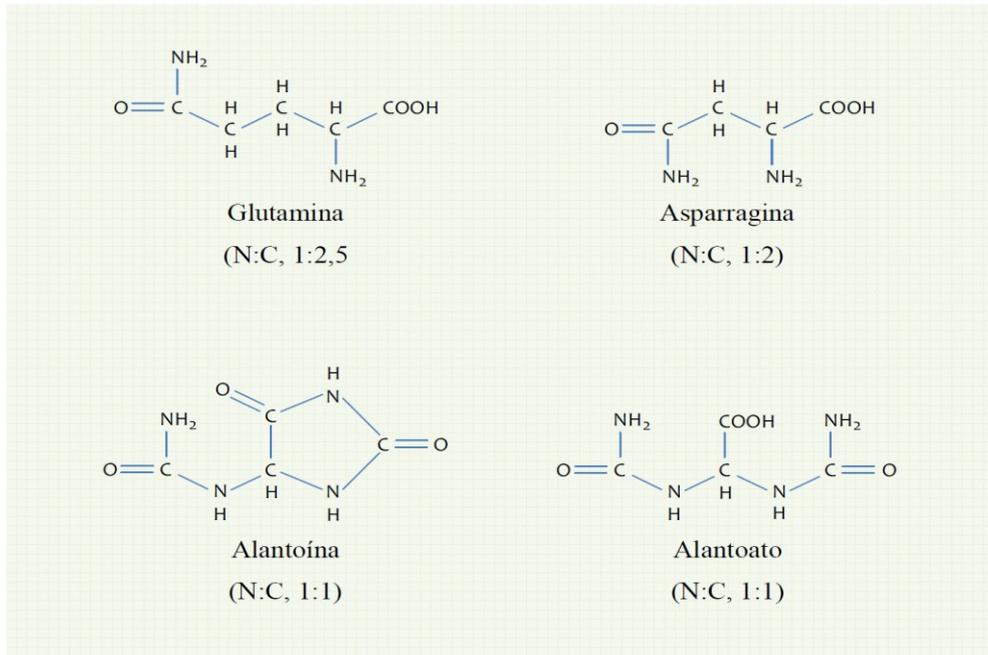


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de los principales ureidos y amidas transportados a través del xilema. Los ureidos (alantoína y alantoato) presentan una relación N:C de 1:1, lo que los hace moléculas más eficaces para el transporte de nitrógeno frente a las amidas que alcanzan una relación N:C menor (1:2, 1:2,5, asparragina y glutamina respectivamente) (Quiles, 2012).

3. METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS

Los nucleótidos son moléculas de vital importancia en todos los seres vivos. Son componentes esenciales de los ácidos nucleicos, participan en procesos bioenergéticos, y forman parte de cofactores de enzimas y de segundos mensajeros (Zrenner et al., 2006). Además, son precursores para la síntesis de metabolitos primarios (como la sacarosa, polisacáridos y fosfolípidos) y también de metabolitos secundarios tan importantes como las citoquininas (Haferkamp et al., 2011). Todo esto hace que sean moléculas de gran importancia durante el crecimiento y desarrollo de las plantas.

El metabolismo de nucleótidos se puede dividir en cuatro fases: síntesis *de novo*, catabolismo de nucleótidos, reciclaje de nucleósidos y nucleobases, y reacciones de fosfotransferencia que transforman nucleótidos mono y difosfato en las formas trifosfato. Además, algunos nucleósidos sufren modificaciones, como los desoxinucleótidos que forman parte del ADN u otros a los que se les añaden cadenas como los que forman parte del ARN transferente. Todo lo anterior hace que el metabolismo de nucleótidos sea considerablemente complejo.

Tanto los nucleótidos de purina como de pirimidina pueden sintetizarse *de novo* o por el reciclaje de nucleósidos y bases nitrogenadas, o absorberse directamente del suelo, donde se encuentran en cantidades considerables (Phillips et al., 1997; Jenkins et al., 2017). El reciclaje de nucleótidos consume una molécula de ATP frente a las cinco que consume la síntesis *de novo* (Jung et al., 2009), por lo que es más económica y puede ser más importante en el mantenimiento del reservorio de nucleótidos en células que no están en crecimiento (Zrenner et al., 2006; Jung et al., 2009). Sin embargo, los tejidos en crecimiento y las células en división dependen mayoritariamente de la síntesis *de novo* (Ashihara et al., 2020a).

La primera reacción de la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina la cataliza la fosforribosil amidotransferasa (PRAT), que transfiere el grupo amino de la glutamina al fosforribosil pirofosfato, para dar lugar a fosforribosil amina. Esta enzima es clave en la síntesis de purinas (Möhlmann et al., 2010), se retroinhibe por los productos finales de la síntesis de purinas (Reynolds et al., 1984) y se induce por la glutamina, sustrato de la reacción (Kim et al., 1995). A continuación, se suceden nueve reacciones enzimáticas localizadas en plastidios y mitocondrias que permiten la síntesis de inosina monofosfato (IMP), a partir del cual se sintetizan AMP, GMP y XMP (Zrenner et al., 2006; Witte y Herde, 2020). La síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina conduce a la formación de uridina monofosfato (UMP) en una ruta conocida como ruta del orotato y que implica a enzimas plastídicas, citosólicas y mitocondriales (Zrenner et al., 2006; Witte y Herde, 2020). Los nucleótidos de citosina y timina se sintetizan a partir de UTP (Zrenner et al., 2006; Witte y Herde, 2020).

Los nucleósidos y las bases nitrogenadas procedentes del metabolismo de la planta o absorbidos del suelo pueden reciclarse y utilizarse para sintetizar nuevos nucleótidos. Las bases nitrogenadas pueden reaccionar con fosforribosa para formar el respectivo nucleótido, en una reacción catalizada por fosforribosil transferasas (PRTs), mientras que

los nucleósidos pueden fosforilarse para formar nucleósidos monofosfato por acción de kinasas. En plantas, se conocen varios ejemplos que demuestran la importancia del reciclaje de los nucleótidos. Así, mutantes de *APT1*, que codifica la principal adenina-fosforibosil transferasa (APRT) crecen más lentamente y se caracterizan porque su polen es estéril (Moffatt y Somerville, 1988; Gaillard et al., 1998), y mutantes carentes o con la expresión de la principal adenosina kinasa (ADK1) muy reducida presentan alteraciones en las reacciones de transmetilación, ya que la acumulación de adenosina inhibe la S-adenosilhomocisteína hidrolasa, una enzima del ciclo de la S-adenosil homocisteína (SAM), lo que da lugar a alteraciones en el desarrollo de la planta (Moffatt et al., 2002; Young et al., 2006) En cambio, el reciclaje de guanina e hipoxantina parece ser menos crítico, ya que mutantes de la hipoxantina guanosina fosforibosil transferasa (HGPRT) no presentan grandes alteraciones fenotípicas (Liu et al, 2007; Schroeder et al., 2018).

En plantas, como en la mayoría de animales y microorganismos, el catabolismo de pirimidinas implica la reducción de uracilo y timina hasta CO_2 , NH_3 y β -alanina o β -aminoisobutirato, respectivamente (Ashihara et al., 2020b). La degradación de citidina necesita de su desaminación hasta uridina por acción de la citidina deaminasa, cuya mutación da lugar a plantas más pequeñas, posiblemente porque la acumulación de citidina es tóxica para la planta (Chen et al., 2016). De hecho, la acumulación de nucleósidos suele afectar negativamente a las plantas (Witte y Herde, 2020), lo que es indicativo de la importancia del mantenimiento de un correcto equilibrio entre la síntesis, reciclaje y degradación de estas moléculas. En *Arabidopsis*, la hidrólisis de uridina la cataliza NSH1, una nucleósido hidrolasa citosólica (nucleosidasas, NSH), que produce uracilo y ribosa (Jung et al., 2009).

Por otro lado, mientras que la mayoría de los animales sólo pueden degradar las purinas hasta urato o alantoína (Ashihara et al., 2020c) las plantas pueden oxidarlas completamente y recuperar el nitrógeno presente en ellas (Muñoz et al., 2006; Todd et al., 2006; Werner et al., 2008; Werner y Witte 2011). Además, la oxidación de purinas permite generar compuestos intermediarios de gran importancia para las plantas, entre los que se encuentran los ureidos, de los que se tratará en la sección 4.1. La guanina, la adenina y la adenosina necesitan reciclarse hasta el nucleósido monofosfato (AMP o GMP) antes de ser degradados. El AMP se desamina hasta IMP, que se oxida a xantina monofosfato (XMP) por acción de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (Shelp et al., 1983). A continuación, los nucleósidos monofosfato tiene que ser

desfosforilados. Recientemente se ha identificado y caracterizado una xantosina monofosfato fosfatasa (XMPP) (Heinemann et al., 2021) que es la principal enzima que cataliza la entrada irreversible de los derivados de adenina en la ruta de degradación. También en judía se han identificado dos fosfatasas con alta afinidad por los nucleótidos (Cabello-Díaz et al., 2012, 2015; Galvez-Valdivieso et al., 2020). Por otro lado, una GMP fosfatasa aún sin identificar, junto a la guanosina deaminasa (GSDA) (Dahncke y Witte 2013) deben de regular la entrada de los derivados de guanina. Ambas rutas confluyen en la formación del nucleósido xantosina, y marca un punto de no retorno en la degradación de purinas, ya que la xantosina no puede ser reciclada (Ying et al., 2014). Al igual que en el catabolismo de pirimidinas, el siguiente paso en la ruta de degradación de purinas lo catalizan las nucleosidasas enzimas que hidrolizan la xantosina hasta xantina y ribosa (Jung et al., 2011, Baccolini y Witte, 2019, Delgado-García et al., 2021). Las nucleosidasas se han postulado como enzimas clave en el control del equilibrio entre degradación y reciclaje de nucleótidos (Möhlmann et al., 2010) y se tratarán con más profundidad en el apartado 5. La xantina y la hipoxantina son catabolizadas hasta urato por la misma enzima, la xantina deshidrogenasa (XDH) (Triplett et al., 1980; Urarte et al., 2015). Posteriormente, el urato es transportado al peroxisoma, donde es oxidado por la urato oxidasa (UOX), que inicia una serie de tres reacciones que generan intermediarios inestables hasta formar S-alantoína (Lamberto et al., 2010; Werner y Witte., 2011), que se transporta al retículo endoplásmico donde la alantoína amidohidrolasa (alantoínasa) cataliza su transformación en alantoato (Hanks et al., 1981; Raso et al., 2007; Werner et al., 2008). El alantoato se puede catabolizar por dos vías. Por una de ellas se produce urea y ureidoglicolato por acción de la alantoicasa (alantoato amidinohidrolasa) (Todd et al., 2006; Raso et al., 2007) y, posteriormente, el ureidoglicolato se degrada a glioxilato y urea por acción de una ureidoglicolato urea liasa (Muñoz et al., 2006; Todd et al., 2006). La otra vía genera CO_2 , NH_4^+ y ureidoglicina, en una reacción catalizada por la alantoato amidohidrolasa (Diaz-Leal et al., 2014). La ureidoglicina es un compuesto muy inestable que se transforma rápidamente en ureidoglicolato, que a su vez forma glioxilato, NH_3 y CO_2 mediante una amidohidrolasa (Werner et al., 2008; Werner y Witte 2011).

4. PROCESOS FISIOLÓGICOS EN LOS QUE JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EL METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS

4.1. Nucleósidos como precursores de ureidos e importancia fisiológica de los ureidos

Como se ha comentado anteriormente, los ureidos desempeñan un papel fundamental en el transporte del nitrógeno fijado en los nódulos de las leguminosas ureídicas hasta las partes aéreas, de modo que en plantas que dependen de la fijación biológica de nitrógeno constituyen la principal molécula orgánica nitrogenada presente en su fluido xilemático (Schubert 1986; Todd et al., 2006; Diaz-Leal et al., 2012).

La síntesis de ureidos en los nódulos de las leguminosas ureídicas requiere de multitud de reacciones enzimáticas que implican tanto a las células infectadas como a las no infectadas, y de dos rutas metabólicas ya comentadas: la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina y la oxidación enzimática de los nucleótidos de purinas (Zrenner et al., 2006; Voß et al., 2022). El nitrógeno fijado en los bacteroides se libera como amonio y se incorpora a la glutamina, que actúa como donador de grupo amino en la primera reacción de la síntesis *de novo* de purinas, dando lugar, tras nueve reacciones enzimáticas, a IMP. La ruta principal de síntesis de ureidos comienza con la oxidación de IMP a XMP, gracias a la acción de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (Shelp et al., 1983). A continuación, el XMP se hidroliza hasta fosfato y xantosina mediante la xantosina monofosfato fosfatasa (XMPP) (Heinemann et al., 2021). Parte del XMP puede aminarse por la GMP sintetasa para formar GMP. Se ha planteado que, debido a que el XMP en las células infectadas es muy abundante, en dichas células se alcanzan niveles de GMP superiores a sus necesidades, por lo que una parte de este GMP puede ser desfosforilado hasta fosfato y guanosina, y esta última desaminada hasta xantosina por la GSDA (Dahncke y Witte, 2013; Voß et al., 2022). De cualquier manera, aunque esta última ruta contribuye a la síntesis de ureidos, lo hace en mucho menor grado que la desfosforilación del XMP (Voß et al., 2022). Tras esto, la xantosina es transportada a las células no infectadas donde se hidroliza hasta xantina y ribosa por acción de nucleosidasas (NSHs). La xantina, retorna nuevamente a las células infectadas, donde se oxida hasta urato por la XDH (Triplett et al., 1980), el cual sale nuevamente de las células infectadas para ser oxidado hasta S-alantoína en los peroxisomas de las células no infectadas, en una serie de tres reacciones iniciadas por la urato oxidasa (Lambeto et al., 2010; Werner y Witte 2011). Finalmente, la hidrólisis de alantoína a alantoato parece ocurrir en el retículo endoplásmico del tejido vascular (Hanks et al., 1981; Werner et al., 2008; Velickovic et

al., 2018; Voß et al., 2022). Una vez vertidos al xilema, alantoína y alantoato son transportados a distintos órganos, donde pueden ser almacenados o degradados y utilizar el nitrógeno liberado para la síntesis de aminoácidos.

Las razones para este complicado itinerario han sido discutidas recientemente por Voß y col. (2022). Por un lado, en las células no infectadas, las nucleosidasas pueden estar protegidas de la inhibición por guanosina, cuyos niveles son más elevados en las células infectadas debido a la desviación de parte del XMP a GMP. Por otro lado, el ácido úrico es un potente neutralizador (*scavenger*) de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sautin y Johnson, 2008; Tasaki et al., 2017) y nitrógeno (RNS) (Alamillo y García-Olmedo, 2001), lo que podría justificar que la degradación de xantina a ácido úrico ocurra en las células infectadas, ya que en ellas las mitocondrias, una fuente de ROS, son especialmente grandes y abundantes, y la propia XDH se inhibe por RNS y es protegida por el urato (Coletto et al., 2019). Por otro lado, la reacción de la urato oxidasa peroxisomal requiere oxígeno, lo que justifica la presencia de esta enzima en las células no infectadas donde existe mayor disponibilidad de oxígeno.

Además de su papel como moléculas de transporte del nitrógeno fijado simbióticamente en leguminosas ureídicas, los ureidos también podrían tener un papel importante en otros procesos. Diversos estudios muestran que los ureidos pueden sintetizarse por mecanismos que no implican la fijación biológica del nitrógeno. Así, se ha demostrado que los niveles de ureidos aumentan sustancialmente durante la fase reproductiva de la planta y la senescencia (Díaz-Leal et al., 2012; Lambert et al., 2017), momentos en los que la fijación de nitrógeno disminuye debido a la senescencia de los nódulos. También podrían tener un papel importante en otros procesos en los que se produce una elevada movilización de nitrógeno, como la germinación y el desarrollo posgerminativo de las plántulas. Así, las semillas secas de judía acumulan ureidos (Quiles et al., 2009), que podrían sintetizarse o almacenarse durante la formación del fruto. Durante el desarrollo posgerminativo de judía se ha descrito síntesis y acumulación de ureidos en sus ejes y cotiledones durante el desarrollo posgerminativo (Quiles et al., 2009, 2019), los cuales podrían sintetizarse *de novo*, a partir del nitrógeno presente en las proteínas de reserva de las semillas o del reciclaje de ácidos nucleicos, los cuales son relativamente abundantes en las semillas (Deltour, 1985). Los ureidos sintetizados y acumulados durante la germinación y el desarrollo posgerminativo también podría desempeñar un papel adicional al de actuar como moléculas de reserva de nitrógeno. Asimismo, se ha descrito aumento en la

concentración de ureidos durante el desarrollo de otras leguminosas antes de ser noduladas (Baral et al., 2012). Además, los ureidos también están presentes en plantas no leguminosas (Baral et al., 2016). En los últimos años, se ha descrito que los ureidos podrían desempeñar un papel importante en la respuesta a distintos tipos de estreses. Así, se ha descrito que plantas de *Arabidopsis* deficientes en XDH sometidos a senescencia inducida por oscuridad presentan síntomas prematuros de senescencia y acumularon más H₂O₂, y que dicha sensibilidad remite cuando se les suministra alantoína o alantoato (Brychkova et al., 2008). Mutantes con la expresión de la XDH reducida también fueron más sensibles al estrés hídrico y acumularon más H₂O₂ (Watanabe et al., 2010), lo que revirtió tras tratamiento con ácido úrico. Recientemente, se ha sugerido que plantas ureídicas y amídicas pueden seguir diferentes estrategias en la respuesta a situaciones que generan estrés oxidativo (Quiles et al., 2019). Existen diversos estudios que muestran la acumulación de ureidos en leguminosas y no leguminosas en respuesta a estrés hídrico (Alamillo et al., 2010; Bowne et al., 2011; Oliver et al., 2011; Silvente et al., 2012; Degenkolbe et al., 2013; Yobi et al., 2013; Casartelli et al., 2018, 2019), salino (Kanani et al., 2010; Wu et al., 2012; Nam et al., 2015; Wang et al., 2016; Irani y Todd, 2018), y por baja temperatura (Kaplan et al., 2004). Además, también se ha descrito el descenso de sus niveles en condiciones de déficit de nitrógeno o aumento del ratio N:C (Amiour et al., 2012; Coneva et al., 2014; Casartelli et al., 2019; Lescano et al., 2020), así como que sus niveles regulan la adquisición y la fuente de nitrógeno y carbono en plantas no fijadoras de nitrógeno, así como los procesos de transporte de nitrógeno y carbono desde las fuentes a los sumideros (Thu et al., 2020) lo que remarca la importancia de los ureidos para el crecimiento y desarrollo.

4.2. Germinación y desarrollo posgerminativo

La germinación de la semilla y el desarrollo posgerminativo son fases cruciales en el ciclo de vida de las plantas superiores. La semilla es el eje central en el ciclo de vida de una planta, ya que es el inicio a partir del cual se desarrolla la planta adulta. La germinación es un proceso muy complejo que permite que la semilla recupere rápidamente la actividad fisiológica que quedó suspendida al final de su desarrollo, aumente la intensidad de su metabolismo, complete los eventos celulares esenciales que dan lugar a la emergencia del embrión y se prepare para el posterior crecimiento de la plántula (Nonogaki et al., 2010). Por definición, la germinación comienza con la toma de agua por la semilla y se completa cuando emerge el eje embrionario, lo que en la mayoría de las especies implica la

emergencia de la radícula (Bewley, 1997). La germinación es un proceso fuertemente regulado por factores ambientales y hormonales, lo que permite que únicamente tenga lugar cuando las condiciones son propicias para que la planta emergente pueda desarrollarse. Entre los primeros destacan la humedad, el oxígeno, que debe de alcanzar niveles que permitan la respiración aeróbica, una temperatura adecuada para que se puedan llevar a cabo los distintos procesos fisiológicos y la luz. En la regulación hormonal juegan un papel clave dos hormonas, el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas, que desempeñan papeles antagónicos. El ABA induce y mantiene las semillas en estado latente, de modo que, en la transición a la germinación, sus niveles se reducen y se induce la síntesis y acumulación de giberelinas, que desencadenan la rotura de la dormición (Rodríguez-Gacio et al., 2009).

En los procesos de germinación y desarrollo posgerminativo se pueden distinguir tres fases asociadas al curso temporal de la absorción de agua por parte de la semilla (Nonagaki et al., 2010) (Figura 3). En la primera fase se produce una rápida e intensa absorción de agua, se reanuda la actividad metabólica y se activa el metabolismo respiratorio. Durante la segunda fase se reduce la absorción de agua, aumenta el

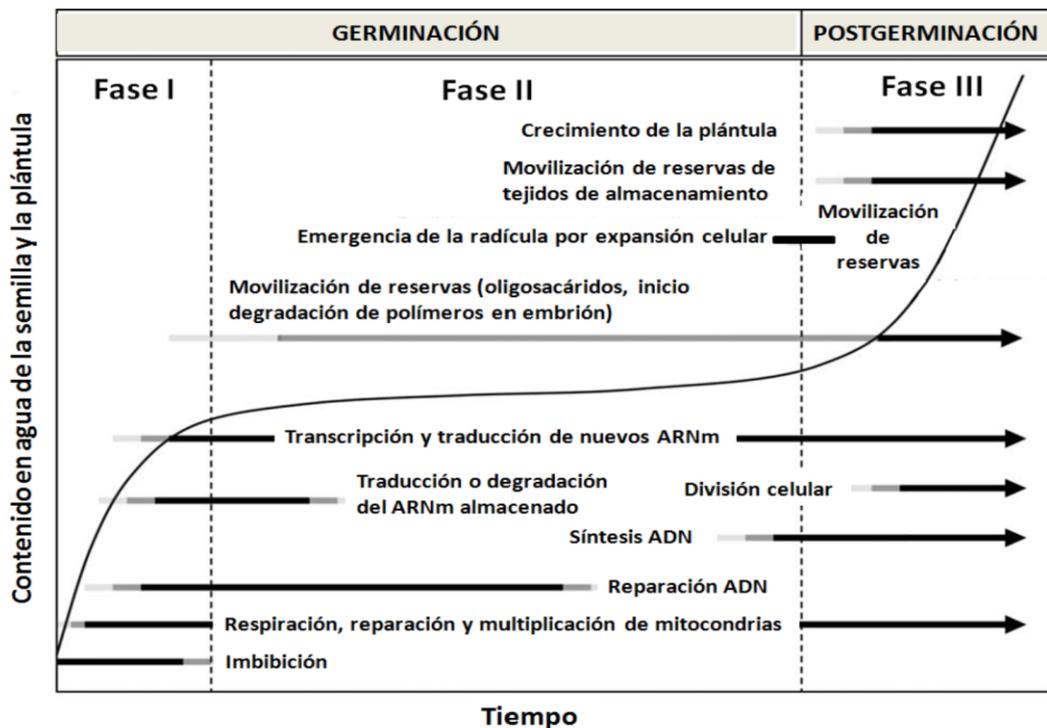


Figura 3. Fases de la germinación y desarrollo posgerminativo temprano. La curva representa la absorción de agua por parte de la semilla. Se muestran los procesos metabólicos y físicos que tienen lugar durante el desarrollo de la semilla. (Adaptado de Nonogaki et al., 2010).

metabolismo energético, y se reinician la transcripción y la traducción. Esto provoca la expansión del embrión y, finalmente, la emergencia radicular. La tercera fase se corresponde con el inicio del desarrollo posgerminativo. En ella, se reinicia la absorción de agua a medida que las células de la radícula y el resto de la plántula aumentan debido a las divisiones mitóticas y la expansión celular, y se intensifica la removilización de las sustancias de reserva que se transportan hacia los ejes embrionarios en desarrollo (Nanogaki et al., 2010).

Durante la germinación y desarrollo posgerminativo se produce una gran movilización de los nutrientes almacenados en los cotiledones, que son los principales órganos de reserva en las semillas. Durante la imbibición ocurren importantes cambios en la concentración de aminoácidos libres (Glevarec et al., 2004; Aznala et al., 2006). Generalmente, la movilización de proteínas de reserva ocurre en primer lugar en los ejes embrionarios y, una vez agotadas, se movilizan las de los cotiledones (Tiedemann et al., 2000). En éstos, el catabolismo de las proteínas de reserva libera gran cantidad de aminoácidos que se exportan al eje para favorecer el crecimiento posgerminativo (Herrera-Rodríguez et al., 2006). En judía, el nivel de aminoácidos libres disminuye levemente al inicio de la germinación, pero vuelve a aumentar durante la emergencia radicular como consecuencia de la movilización de proteínas de reserva (Quiles et al., 2009).

La información disponible acerca del metabolismo de purinas y pirimidinas durante la germinación y el desarrollo posgerminativo es limitada, y muchos de los datos disponibles proceden de estudios realizados utilizando precursores marcados radioactivamente (Ashihara et al., 2018). Estos trabajos han demostrado que, para que la germinación se lleve a cabo con éxito, es esencial la disponibilidad de nucleótidos durante las fases tempranas de este proceso, ya que estos no solo son esenciales en la multitud de procesos bioenergéticos requeridos para la movilización de moléculas de reserva, sino que hace falta un metabolismo de nucleótidos activo para proporcionar al embrión suficientes nucleótidos de purina y pirimidina para la síntesis de ácidos nucleicos (Deltour 1985). Por tanto, el balance entre síntesis *de novo*, reciclaje y degradación debe de estar estrictamente regulado en estas primeras etapas del desarrollo de las plántulas, hasta el punto de que es crítico para el éxito de la germinación (Stasolla et al., 2003; Jung et al., 2009; Cornelius et al., 2011).

Diferentes estudios han demostrado que en la fase inicial de la germinación la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos depende principalmente del reciclaje de nucleósidos y

nucleobases, mientras que, en las etapas posteriores, la demanda de ácidos nucleicos se satisface principalmente por las vías *de novo*, y las vías catabólicas aumentan para proporcionar carbono y nitrógeno a las plántulas en crecimiento (Ashihara et al., 2020c).

En las fases iniciales de la germinación, la síntesis de nucleótidos de purina depende principalmente del reciclaje de adenina, adenosina guanina y guanosina (Anderson 1977; Guranowski 1979; Guranowski y Barankiewicz 1979; Ashihara 1983; Nobusawa Ashihara 1983; Ashihara et al., 1997; Stasolla et al. 2001b). De hecho, uno de los primeros procesos metabólicos que ocurre en las semillas embebidas es el aumento rápido de los niveles de ATP, motivado principalmente por el reciclaje de adenosina y adenina (Anderson, 1977). Además de los estudios con marcaje radioactivo, en las últimas décadas se han realizado estudios moleculares que confirman la importancia del reciclaje de purinas al inicio de la germinación. Así, mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la adenosina fosforribosil transferasa (APRT), la enzima que fosforila la adenosina para sintetizar AMP, presentan retraso en la germinación y en el crecimiento (Moffatt y Somerville, 1988). Conclusiones similares se obtuvieron tras el análisis funcional de la HGPT. La tasa de germinación de mutantes de pérdida de función (*hgpt1-1*) se reduce horas después de la imbibición, mientras que aumenta en mutantes que sobreexpresan dicho gen (Liu et al., 2007).

Igualmente, el metabolismo de los nucleótidos de pirimidina está fuertemente regulado durante la germinación, de modo que, en las primeras fases de la germinación, tiene más importancia el reciclaje. Por ejemplo, en cotiledones de *Vigna mungo*, la utilización de uracilo y uridina para la síntesis de ARN y nucleótidos aumenta considerablemente durante las primeras 24 h de la germinación, para descender en las fases finales (Ashihara, 1977). Algo similar ocurre en embriones de *Picea glauca* (Stasolla et al., 2001a; 2002). A medida que la germinación progresa, la contribución de las rutas de reciclaje disminuye, y cobra más relevancia la síntesis *de novo* (Ross y Murray 1971; Stasolla et al., 2001c, 2002), que parece ser crítica para asegurar unos niveles de nucleótidos suficientemente elevados como para sustentar la síntesis de ácidos nucleicos (Ashihara et al., 2020d). Al igual que ha ocurrido con el metabolismo de las purinas, estudios moleculares realizados en las últimas décadas han puesto de manifiesto la importancia del reciclaje y la síntesis *de novo* de pirimidinas durante la germinación y el desarrollo posembrionario temprano (Chen y Slocum, 2007; Jung et al., 2009; Mainguet et al., 2009; Cornelius et al., 2011; Witz et al., 2012; Pedroza-García et al., 2019).

En judía se ha descrito un incremento en la actividad nucleotidasa así como en la expresión de dos genes que codifican posibles nucleotidasas (Cabello-Díaz et al., 2012, 2015; Galvez Valdivieso et al., 2020) y de actividades degradadoras de ácidos nucleicos (Lambert et al., 2014, 2016; Díaz-Baena et al., 2021) durante el desarrollo de la plántula.

4.3. Nucleótidos como moléculas señalizadoras

Todos los organismos vivos y sus células presentan mecanismos específicos para percibir, traducir y responder a la gran variedad de estímulos a los que están expuestos, tanto abióticos como bióticos (Isner y Maathius, 2016). En plantas, se conoce que estas señales originan una cascada de señalización que da lugar a una serie de respuestas como la modificación de actividades enzimáticas, de la estructura del citoesqueleto y de la expresión de genes (Pietrowska-Borek et al., 2020). Durante mucho tiempo se consideró que las únicas moléculas implicadas en la señalización celular en plantas eran las hormonas. Sin embargo, en los últimos años, se ha constatado el papel de otras moléculas implicadas como segundos mensajeros, entre los que se encuentran el Ca^{2+} citosólico (Edel et al., 2017) las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) (Del Rio, 2015) y los nucleótidos. Entre estos últimos, destacan los nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP (Pietrowska-Borek et al., 2014), el eATP, y otros nucleótidos menos comunes (Pietrowska-Borek et al., 2020).

4.3.1. cAMP y cGMP

Los nucleótidos monofosfato cíclicos (cNMPs) como el adenosín 3,5-monofosfato cíclico (cAMP) y el guanosín 3,5-monofosfato cíclico (cGMP) son moléculas que se sintetizan a partir de los nucleótidos trifosfato por acción de nucleótido ciclasas y que participan en rutas de transducción de señales en todos los organismos vivos (Swiezawska et al., 2018). A pesar de que su papel como segundos mensajeros en animales se conoce desde hace más de 50 años, su participación en procesos de señalización en plantas fue objeto de debate durante décadas, principalmente debido a que sus niveles son significativamente inferiores a los de células animales (nM frente a μM) y a que, durante mucho tiempo, estas concentraciones tan reducidas no podían detectarse con la metodología disponible en esos momentos (Gehring y Turek, 2017). Sin embargo, numerosos estudios electrofisiológicos, celulares y moleculares han puesto de manifiesto que las variaciones en los niveles de cNMPs en plantas tienen un efecto directo en el flujo

de cationes como el K^+ , el Na^+ y el Ca^{2+} , despertando el interés en estas moléculas como reguladores potenciales de la homeostasis de iones y agua (Gehring y Turek, 2017).

Al igual que en animales, muchas de las funciones de los cNMPs de plantas están mediadas a través de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (CNGCS), muchos de los cuales son claves en la respuesta a señales bióticas y abióticas (Kaplan et al., 2007; Jha et al., 2016). Así, en los últimos años se ha descrito el papel de los cNMPs en multitud de procesos fisiológicos, entre los que destacan la progresión del ciclo celular y la proliferación celular, el crecimiento y la diferenciación, el desarrollo de orgánulos, la geminación, la floración, el control de la apertura de las estomas, así como la precepción de estímulos abióticos y bióticos y sus correspondientes respuestas (Gehring y Turek, 2017).

4.3.2. Nucleótidos extracelulares

En el espacio extracelular de las células vegetales se han identificado tanto nucleótidos como sus derivados (Riewe et al., 2008; Daumann et al., 2015). Aunque su origen no está claro, se ha propuesto que dichos nucleótidos podrían liberarse de células intactas o dañadas, proceder de los productos de degradación de nucleótidos vertidos al espacio apoplástico desde el interior de la célula, o importarse desde la rizosfera, en los que se encuentran en concentraciones considerables (Phillips et al., 1997; Traub et al., 2007; Möhlmann et al., 2014; Jenkins et al., 2017). Sin embargo, no ha sido hasta hace relativamente poco tiempo cuando ha comenzado a estudiarse su papel, principalmente debido a la confirmación del papel señalizador del ATP extracelular (eATP) (Cao et al., 2014; Pietroska-Borek et al., 2020).

El eATP es una molécula señal que puede liberarse al exterior celular tras un estímulo vía exocitosis (Kim et al., 2006), por un transportador (Thomas et al., 2000; Rieder y Neuhaus, 2011), o debido al daño celular (Song et al., 2006). Una vez en el exterior de la célula, el eATP interacciona con su receptor, lo que desencadena una cascada de señalización que induce cambios fisiológicos que protegen a la planta frente a estreses bióticos y abióticos, pero también garantiza que esta crezca y se desarrolle de manera adecuada (Lim et al., 2014).

Para actuar como molécula señalizadora de manera eficiente, el eATP debe de poder ser retirado del apoplasto una vez ejerza su función, lo que ocurre por la acción concertada de apirasas y nucleotidasas (Steinebrunner et al., 2003; Wolf et al., 2007, Jung et al.,

2011). La adenosina resultante puede reimportarse a la célula a través de transportadores de nucleósidos (Chen et al., 2006; Traub et al., 2007; Möhlmann et al., 2014) o hidrolizarse hasta adenina por acción de nucleosidasas (Riewe et al., 2008).

A pesar de que los receptores de eATP en células animales se descubrieron en la década de los setenta (Burnstock, 1976), tuvieron que pasar cuatro décadas más para que se demostrara la existencia de dicho tipo de receptor en plantas (Choi et al., 2014). El primer receptor de plantas con alta afinidad por el eATP fue DORN1 (DOES NOT RESPOND TO NUCLEOTIDES 1), un receptor con actividad serin-treonin quinasa que no solo une ATP, sino también GTP y ADP, pero no AMP ni adenosina (Choi et al., 2014). Una vez unido a dicho receptor, se desencadena una cascada de señalización en la que intervienen segundos mensajeros como el NO, Ca^{2+} y ROS, y procesos de fosforilación mediados por MAPK (Tanaka et al., 2014).

El eATP actúa como señalizador en procesos como el crecimiento de la plántula, el movimiento estomático, el desarrollo del tubo polínico, el crecimiento de pelos radicales, el gravitropismo y la respuesta a distintos tipos de estreses bióticos y abióticos (Jewell et al., 2019; Pietroeska-Borek et al., 2020). Además, en la respuesta a estreses bióticos, existe una interacción cruzada entre la señalización por las hormonas típicas de respuesta a este tipo de estreses (jasmonato, etileno y ácido salicílico) y el eATP (Jewell et al., 2019; Tripathi et al., 2018).

Recientemente, se ha descrito un nuevo papel regulador del eATP. Estudios con el hongo endófito *Serendipita indica* han mostrado que los niveles de eATP y la actividad de su receptor juegan un papel importante en el establecimiento de la simbiosis planta y hongos (Nizam et al., 2019). Así, la secreción de una ecto-5'-nucleotidasa fúngica que hidroliza ATP, ADP y AMP en el apoplasto modifica los niveles de eATP, atenuando la respuesta defensiva de la planta y evitando una muerte celular masiva, permitiendo así la colonización por parte del hongo.

Además del eATP, las plantas también liberan NAD(P)^+ al exterior de sus células (Billington et al., 2006), el cual, también puede jugar un papel señalizador. En *Arabidopsis*, el NAD(P)^+ extracelular (eNAD(P)^+) induce la expresión de genes relacionados con la respuesta a patógenos y la resistencia a *Pseudomonas syringae* a través de rutas que involucran la señalización de defensa mediada por Ca^{2+} y ácido salicílico. También se ha descrito que el eNAD(P)^+ induce cambios transcripcionales y

metabólicos similares a los que ocurren tras una infección por patógenos (Zhang y Mou, 2009), y se ha sugerido que el eNAD(P)⁺ puede ser una molécula señalizadora en procesos de resistencia sistémica adquirida (Zhang y Mou, 2012).

Existe otro grupo heterogéneo de nucleótidos recogido bajo el nombre de nucleótidos no comunes que participan en procesos de señalización en plantas. Algunos de estos compuestos son los mono- y dinucleósidos polifosfato, moléculas constituidas por uno o dos nucleósidos unidos a una cadena de oligofosfato (Pietrowska-Borek et al., 2020). Se ha descrito que los niveles de estos compuestos varían en ciertas condiciones fisiológicas y patológicas, y se ha sugerido que pueden actuar como mensajeros intracelulares en diversos procesos (Zamecnick, 1983; McLennan, 2000). En plantas, existe muy poca información acerca de su función, pero parecen estar involucrados en la regulación de la síntesis de fenilpropanoides, lo que podría estar relacionado con la respuesta a estreses tanto de tipo biótico como abiótico (Pietrowska-Borek et al., 2011, 2015, 2020).

No se conocen los elementos de las rutas de señalización ni los receptores activados por nucleótidos no comunes, pero, en base a los datos existentes que relacionan a estas moléculas con distintos procesos bioquímicos y fisiológicos en bacterias, hongos, animales y plantas, Pietrowska-Borek y col. (2020) han propuesto que los nucleótidos no comunes podrían ser sintetizados por patógenos en el exterior de la célula e interactuar con las células vegetales a través de receptores asociados a la membrana plasmática. Estos nucleótidos también podrían transportarse al interior de las células a través de transportadores de membrana. Además, sus niveles en el interior de las células podrían regularse por enzimas biosintéticas y degradadoras. Tanto los nucleótidos no comunes extracelulares como los intracelulares podrían regular la síntesis de otras moléculas señalizadoras que regulan procesos como el crecimiento, el desarrollo, la respuesta a hormonas, y distintos tipos de estreses tanto bióticos como abióticos.

5. NUCLEÓSIDO HIDROLASAS EN PLANTAS

Las nucleósido hidrolasas, nucleósido N-ribohidrolasas o nucleosidasas (NSH, NRH; EC 3.2.2.-), son una superfamilia de metaloproteínas estructuralmente relacionadas (Murzin et al., 1995; Orengo et al., 1997). Desde el punto de vista funcional, son glucosidasas que catalizan la rotura del enlace N-glucosídico de los nucleósidos dando lugar a una pentosa (ribosa o desoxirribosa) y a la base nitrogenada. Presentan especificidad estricta por la pentosa, y difieren en sus preferencias por la naturaleza de la base nitrogenada (Versees

y Steyaert, 2003). Todas las nucleosidasas identificadas presentan un motivo altamente conservado rico en aspartato DXDXXXDD que se considera el sello distintivo de la actividad nucleosidasa (Versees y Steyaert, 2003).

Las primeras NSHs identificadas y caracterizadas fueron las de algunos protozoos parasíticos (*Trypanosoma*, *Crithidia* y *Leishmania*), en los que catalizan la hidrólisis de los nucleósidos asimilados, lo que les permite reciclar las bases púricas y la ribosa (Hammond y Gutteridge, 1984; Berens et al., 1995). Esto es crítico para dichos organismos, ya que, a diferencia de la mayoría del resto de organismos vivos, son incapaces de sintetizar purinas *de novo*, por lo que dependen de su reciclaje para sobrevivir (Versees y Steyaert, 2003). Desde entonces, se han caracterizado NSHs en bacterias (Petersen y Moller, 2001; Shimizu, 2001) levaduras (Kurtz et al., 2002), insectos (Ribeiro y Valenzuela, 2003), algunos animales (Versees et al., 2003) y plantas (Jung et al., 2011, Kopecna et al., 2013, Baccolini y Witte, 2019), pero nunca en mamíferos (Parkin et al., 1991; Versees y Steyaert, 2003). Estos, presentan nucleósido fosforilasas en lugar de nucleósido hidrolasas, que dan lugar a la base nitrogenada y a ribosa fosfato. La ausencia de NSHs en mamíferos ha incentivado la investigación en torno a dichas enzimas, ya que presentan un alto potencial como dianas terapéuticas frente a diferentes enfermedades que abarcan desde el tratamiento quimioterapéutico o la generación de vacunas frente a parásitos causantes de enfermedades (Figuroa-Villar y Sales, 2017; Alam et al., 2018; Palatnik-de-Sousa, 2019), a activadores de profármacos contra células tumorales (Degano, 2022).

Tradicionalmente, las NSHs se han dividido en cuatro clases según su especificidad de sustrato: NSHs no específicas, NSHs que con preferencia por la inosina y la uridina (IU-NRH; Parkin et al., 1991; Shi et al., 1999); NSHs que prefieren inosina, adenosina y guanosina (IAG-NRH; Parkin, 1996); NSHs de guanosina e inosina (GI-NRH; Estupiñán y Schramm, 1994); y NSHs específicas de citidina y uridina (CU-NRH; Giabbai y Degano, 2004). Sin embargo, estudios posteriores han revelado que esta clasificación es algo artificial e inadecuada, y que un número cada vez mayor de nucleosidasas no encajan inequívocamente en uno de estos grupos (Petersen y Moller, 2001; Mitterbauer et al., 2002; Versees et al., 2003).

En plantas, se han purificado y caracterizado numerosas nucleosidasas y se ha estudiado su actividad en distintas fases del desarrollo de la planta (Ashihara et al., 2018). Además, durante la pasada década se han identificado los genes que las codifican y se han realizado

estudios moleculares (Jung et al., 2009, 2011; Riegler et al., 2011; Kopecna et al., 2013; Baccolini y Witte 2019).

En plantas se han identificado nucleosidasas con localización citosólica y apoplástica (Riewe et al., 2008; Jung et al., 2009; 2011; Kopecna et al., 2013). Las nucleosidasas citosólicas parecen estar codificadas por, al menos, dos genes (Riegler et al., 2011; Jung et al., 2011; Kopecna et al., 2013). En *Arabidopsis*, NSH1 es la única nucleosidasa que hidroliza uridina en cantidades significativas (Jung et al., 2009; Riegler et al., 2011; Baccolini y Witte, 2019), pero también es capaz de hidrolizar otros nucleósidos de purina como xantosina e inosina. Por ello, se ha propuesto que NSH1 es la principal actividad degradadora de nucleósidos de purina y pirimidina (Jung et al., 2011). En cuanto a NSH2, su especificidad de sustrato y su papel era menos claro (Jung et al., 2011; Riegler et al., 2011), aunque se había descrito su inducción en condiciones de senescencia natural (Jung et al., 2011). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que, en *Arabidopsis*, NSH2 necesita interactuar con NSH1 para ser activa, y que dicho heterómero presenta mayor actividad frente a la xantosina y la inosina que NSH1 (Baccolini y Witte, 2019). Además, también se ha demostrado que el heterodímero NSH1/NSH2 es tan efectivo como NSH1 degradando nucleósidos de purina, y que NSH2 es necesario para la correcta regulación del catabolismo de purinas (Baccolini y Witte, 2019). También se ha propuesto que NSH1 puede hidrolizar la citoquinina N6-(2-isopentenil) adenosina (iPR) (Jung et al., 2009), aunque un estudio posterior con mutantes de *NSH1*, *NSH2* y el doble mutante de ambos genes concluyó que el papel de estas dos enzimas en el metabolismo de citoquininas es irrelevante (Riegler et al., 2011). Sin embargo, estudios posteriores con mutantes de *NSHs* del musgo *Physcomitrella patens* y de maíz han confirmado la importancia de las nucleosidasas en el metabolismo de las citoquininas (Kopecna et al., 2013). Estos estudios también han mostrado la importancia de las nucleosidasas durante el desarrollo en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

Se han obtenido las estructuras cristalinas de dos nucleosidasas (PpNSH1 de *Physcomitrella patens* y ZmNSH3 de *Zea mays*), lo que unido a estudios de mutagénesis dirigida y análisis filogenéticos ha permitido identificar residuos importantes para la actividad y los responsables de la diferente afinidad de sustratos (Kopecna et al., 2013). Estos estudios han determinado que las NSHs de plantas se organizan en dímeros, y que esta organización debe de tener un papel importante en la función enzimática. En la estructura destaca la presencia de un átomo de Ca^{2+} en el centro activo que se une

estrechamente a los Asp-25, 30 y 258 (se sigue siempre la notación de PpNSH1) y al grupo carbonilo de la Leu-141. También se han identificado los residuos relacionados con la unión al nucleósido. Así, la ribosa se une fuertemente a un grupo de residuos altamente conservado (Asn-176, Glu-182, Asp-258, Asn-184, Asp-29, Asp-30 y Asn-54), mientras que la nucleobase está rodeada por residuos más variables (Val-98 e His-99 de la α -hélice 3, residuos aromáticos Tyr-242, Tyr-244, His-245, y Tyr-249 de la α -hélice 11; His-257 en la β -hélice 12, Asn-176 en el loop β 5- β 7; la cadena lateral adyacente de la Lys-297, que se proyecta hacia el sitio activo de la otra subunidad y se une por puentes de hidrógeno a la Tyr-244; y el oxígeno de la cadena principal de la Asn-176). La comparación de PpNSH1 y ZmNSH3 mostró que, de todos los residuos que rodean a la nucleobase, solo uno no se conserva en ambas, de modo que la Tyr-244 de PpNSH1 está sustituida por Trp en ZmNSH3. Tanto experimentos de acoplamiento molecular (*docking*) como el análisis de las propiedades cinéticas de dichas enzimas resaltan la importancia de las Tyr-244 y 249 en la unión a la purina, y sugieren que el residuo que ocupa la posición de la Tyr-249 debe de ser clave para determinar la especificidad de sustrato. Esto ha quedado corroborado comparando los datos cinéticos de distintas NSHs con un análisis filogenético detallado. Estos últimos han mostrado que las nucleosidasas de plantas se organizan en dos grupos, de modo que existe una estrecha relación entre dichos grupos y las propiedades enzimáticas de las nucleosidasas (Kopečna et al, 2013). El clado I incluye a las nucleosidasas de la subclase Ia, las cuales contienen Tyr-249 y Tyr-244 (anotado según PpNSH1) lo que es indicativo de una mayor afinidad por xantosina e inosina. El clado II comprende mayoritariamente a la subclase II, en la que se agrupan las nucleosidasas que presentan un Asp-249 y un Trp-244, lo que está asociado a una mayor preferencia por uridina y xantosina. Dentro del clado II hay algunas secuencias que contienen Tyr-249 y Tyr-244 en lugar de Asp y Trp, respectivamente, y que tienen mayor preferencia por xantosina e inosina en lugar de uridina, por lo que pertenecen funcionalmente a la subclase Ib (Tyr-249 y Tyr-244).

En cuanto a las nucleosidasas apoplásticas, se dispone de menos información. Se ha descrito una actividad nucleosidasa asociada al espacio apoplástico de tubérculos de patata que hidroliza adenosina pero no inosina, y que podría estar asociada al reciclaje de eATP (Riewe et al., 2008). En *Arabidopsis*, se ha identificado un gen que codifica una nucleosidasa de 891 aminoácidos (AtNSH3) y que presenta una estructura en tándem con dos dominios nucleosidasa (DXDXXXDD y DXDXXXGD) (Jung et al., 2011). AtNSH3

debe de estar localizada en el espacio apoplástico, ya que aparece en esa fracción en dos estudios proteómicos independientes (Borderies et al., 2003; Kwon et al., 2005). Mutantes de pérdida de función de *AtNSH3* no presentaron un fenotipo distintivo en condiciones estándar, pero, al contrario de lo que ocurrió en plantas silvestres, su fluido apoplástico careció de actividad degradadora de adenosina e inosina, lo que permitió concluir que *AtNSH3* representa la principal actividad extracelular degradadora de ambos nucleósidos (Jung et al., 2011). Además, la expresión de *AtNSH3* se indujo en cultivos líquidos de plántulas de *Arabidopsis* tras la adición de ácido jasmónico y tras herida, lo que sugiere que *AtNSH3* participa en la respuesta a herida o frente a patógenos (Jung et al., 2011). Posteriormente, Daumann y col. (2015) utilizaron dobles mutantes de *AtNSH3* y *ENT3* (EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER 3), el principal transportador de nucleósidos (Traub et al., 2007), para mostrar que la acumulación de nucleósidos en el apoplasto provoca una reducción en la eficiencia fotosintética del PSII, y mayor susceptibilidad al hongo necrotrófico *Botrytis cinerae* (Daumann et al., 2015), lo que, junto a otros resultados sugiere un papel de *AtNSH3* en la eliminación de los productos de degradación de la señalización por eATP.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Los nucleótidos son moléculas de vital importancia en todos los seres vivos, ya que forman parte de los ácidos nucleicos, de cofactores de coenzimas y de segundos mensajeros, además de participar en procesos bioenergéticos o ser precursores para la síntesis de metabolitos primarios y secundarios. Además, los nucleótidos de purina son particularmente importantes en las leguminosas ureídicas como la judía, ya que la xantina es el precursor de los ureidos, moléculas que juegan un papel esencial en el transporte y almacenamiento de nitrógeno en estas leguminosas. Por otro lado, distintos trabajos de nuestro grupo han destacado la importancia de los ureidos durante las primeras fases del desarrollo posgerminativo y sugieren una conexión entre el catabolismo de ácidos nucleicos, nucleótidos y ureidos. De entre todas las enzimas que participan en la síntesis, reciclaje y degradación de nucleótidos, las nucleosidasas, enzimas que hidrolizan los nucleósidos para dar lugar a la pentosa y la base nitrogenada, se han postulado como claves en el control del equilibrio entre degradación y reciclaje de nucleótidos. Por otro lado, también se ha propuesto que algunas nucleosidasas localizadas en el espacio apoplástico tienen un papel relacionado con la defensa frente a estrés biótico. Por tanto, la hipótesis de este trabajo es que las nucleosidasas citosólicas de judía deben de desempeñar un papel relevante en la movilización de nutrientes durante la germinación y desarrollo postgerminativo, así como en la síntesis *de novo* de ureidos en los nódulos de judía, mientras que el papel de las nucleosidasas apoplásticas podrían estar relacionado con la defensa frente a estreses.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es dilucidar el papel de las nucleosidasas de judía durante la germinación y desarrollo posgerminativo, y durante la síntesis *de novo* de ureidos en los nódulos, así como su implicación en la defensa de *Phaseolus vulgaris*. Esto se llevará a cabo a través de los siguientes objetivos específicos:

- Identificación y caracterización de los genes que codifican la familia génica de las nucleosidasas en judía.
- Caracterización de sus actividades enzimáticas.
- Estudio del papel de las nucleosidasas durante la germinación y desarrollo posgerminativo.
- Estudio del papel de las nucleosidasas en la síntesis *de novo* de ureidos en nódulos de judía.
- Estudio del papel de las nucleosidasas apoplásticas en respuesta a situaciones de estrés.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

1.1. SOLUCIONES

1.1.1. Solución para la purificación de ADN plasmídico

Solución I

Tris-HCl	25 mM (pH 8)
EDTA	10 mM
Glucosa	50 mM

Solución II

NaOH	0,2 N (diluida en el momento a partir de una solución 5 N)
SDS	1 % (p:v)

Solución III (para un volumen de 100 ml)

Acetato potásico 5 M	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
H ₂ O	28,5 ml

1.1.2. Solución de carga para electroforesis de ADN (6X)

Tris-HCl	10 mM (pH7,6)
EDTA	60 mM
Glicerol	60 % (v:v)
Azul de bromofenol	0,03 % (p:v)
Xylen cianol FF	0,03 % (p:v)

1.1.3. Solución de carga para electroforesis de ARN (2X)

Formamida	95 % (v:v)
EDTA	0,5 mM
Azul de bromofenol	0,025 % (p:v)
Xilen cianol FF	0,025 % (p:v)
SDS	0,025 % (v:v)
Bromuro de etidio	0,025 % (p:v)

1.1.4. Soluciones para geles de poliacrilamida

Gel separador (según porcentaje determinado)

Tris HCl	375 mM (pH 8,8)
Acrilamida (bis)	(2,7 % T, 30 % C)
SDS	0,1 % (v:v)
Persulfato amónico	0,05 % (v:v)
TEMED	0,06 % (v:v)

Gel concentrador

Tris HCl	125 mM (pH 6,8)
Acrilamida (bis)	(2,7 % T, 30 % C) al 4 %
SDS	0,1 % (v:v)
Persulfato amónico	0,05 % (v:v)
TEMED	0,06 % (v:v)

1.1.5. Solución de revelado de inmunodetección

Tris-HCl	100 mM (pH 9,5)
MgCl ₂	5 mM
Fosfato de 5-bromo-4cloro-3-indol (BCIP)	0,4 mM
Azul de nitrotetrazolio (NBT)	0,37 mM

1.2. TAMPONES**1.2.1. Tampón TB (autoclavado)**

Hepes	10 mM (pH 6,7)
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
MnCl ₂	55 mM

1.2.2. Tampón TBE

Tris	90 mM
H ₃ BO ₃	90 mM
EDTA-NA ₂	2 mM

Ajustar a pH 8 con HCl

1.2.3 Tampón electroforesis

Tris-HCl	250 mM (pH 8,3)
Glicina	520 mM
SDS	0,1 % (p:v)

1.2.4. Tampón de extracción de proteínas para ensayo enzimático

Tris-HCl	50 mM (pH 7,5)
SDS	0,15 mM
EDTA	2 mM
Glicerol	10 % (v:v)
β-mercaptoetanol	0,1 %
PMSF	0,5 mM

1.2.5. Tampón de carga Laemmli

Tris-HCl	120 mM (pH 6,8)
β -mercaptoetanol	71,5 mM
SDS	6 % (p:v)
Azul de bromofenol	0,025 % (p:v)
Glicerol	30 % (v:v)

1.2.6. Tampón TBS

Tris-HCl	25 mM (pH 7,4)
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM

1.2.7. Tampones para purificación de proteínas en columna NSFF**Tampón de inicio**

Na ₂ HPO ₄	20 mM (pH7,4)
NaCl	500 mM
Imidazol	10 mM

Tampón de elución

Na ₂ HPO ₄	20 mM (pH7,4)
NaCl	500 mM
Imidazol	100, 300 o 500 mM

Tampón de regeneración de columna NSFF

Na ₂ HPO ₄	20 mM (pH 7,4)
NaCl	500 mM
EDTA	50 mM

1.2.8. Tampón de infiltración de *N. benthamiana*

MES	10 mM (pH5,6)
MgCl ₂	10 mM
Acetosiringona	200 μ M

1.2.9. Tampones para purificación proteínas con StrepTactin-sepharose**Tampón de extracción de proteínas de hojas de *N. benthamiana***

Tris-HCl	100 mM (pH 8)
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DTT	10 mM
Triton X-100	5 %
PVPP	2 % (p:v)

PMSF	1 mM
------	------

Tampón de lavado de columna Strep Tactin sepharose

Tris-HCl	100 mM (pH 8)
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Triton X-100	0,05 %
PMSF	1 mM

Tampón de elución

Tris-HCl	100 mM (pH 8)
NaCl	150 mM
DTT	1 mM
Triton X-100	0,05 %
Destiobiotina	2,5 mM

1.2.10. Tampón de transferencia para inmunodetección

Tris-HCl	25 mM (pH 8,3)
Glicina	192 mM
Metanol	20 % (v:v)

1.3. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

Todos los medios se esterilizaron por autoclave.

1.3.1. Medio LB (Para medio LB sólidos, se añadió agar al 1,5 % (p:v))

NaCl	10 g/l
Bacto-triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l

1.3.2. Medio 2YT

NaCl	5 g/l
Bacto-triptona	16 g/l
Extracto de levadura	10 g/l

1.3.3. Medio para *Rhizobium*

K ₂ HPO ₄	2,3 mM
KH ₂ PO ₄	0,73 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,81 mM
NaCl	0,36 mM
Extracto de levadura	0,8 g/l
Manitol	55 mM (pH 7,2)

1.4. SOLUCIONES NUTRITIVAS PARA PLANTAS

1.4.1. Solución nutritiva H&P (modificada de Harper y Gibson, 1984)

KH ₂ PO ₄	0,10 mM (pH 6,5)
K ₂ SO ₄	0,30 mM
MgSO ₄	0,20 mM
CaCl ₂	0,11 mM
FeSO ₄	0,25 mM
H ₃ BO ₃	46 µM
MnSO ₄	12,30 µM
ZnSO ₄	0,77 µM
CuSO ₄	0,32 µM
NaMoO ₄	0,63 µM

Para las plantas que se fertilizaron con nitrato, esta solución se suplementó con KNO₃ 10mM.

1.4.2. Solución nutritiva B&D (Broughton and Dilworth, 1971)

Sol A:	CaCl ₂ 2 M
Sol B:	KH ₂ PO ₄ 1 M (pH 7)
Sol C:	Fe citrato 20 mM
Sol D:	MgSO ₄ 0,5 M
	K ₂ SO ₄ 0,5 M
	MnSO ₄ 2 mM
	H ₃ BO ₃ 4 mM
	ZnSO ₄ 1 mM
	CuSO ₄ 4 mM
	CoSO ₄ 0,2 mM
	Na ₂ MoO ₄ 0,2 mM

Las soluciones se esterilizaron por autoclave.

Se añaden 500 µl de cada solución en 1 L de agua.

1.5. ANTIBIÓTICOS

Ampicilina: Se preparó en agua a una concentración de 100 mg/ml. Para su utilización se añadió al medio a una concentración de 50-100 µg/ml cuando la temperatura del medio fue inferior a 50 °C.

Kanamincina: Se preparó en agua a una concentración de 50 mg/ml. Para su utilización se añadió al medio a una concentración de 50 µg/ml cuando la temperatura del medio fue inferior a 50 °C.

Spectinomycin: Se preparó en agua a 80 mg/ml. Para su utilización se añadió al medio a una concentración de 80 µg/ml cuando la temperatura del medio fuese inferior a 50 °C.

Rifampicina: Se preparó en DMSO a una concentración de 25 mg/ml. Para su utilización se añadió al medio a una concentración de 25 µg/ml cuando la temperatura del medio fue inferior a 50 °C.

Gentamicina: Se preparó en agua a 15 mg/ml. Para su utilización se añadió al medio a una concentración de 15 µg/ml cuando la temperatura del medio fue inferior a 50 °C.

Carbamicilina: Se preparó en agua a 50 mg/ml. Para su utilización se añadió al medio a una concentración de 50 µg/ml cuando la temperatura del medio fue inferior a 50 °C.

Todos los antibióticos se esterilizaron con un filtro de 0,2 µm (salvo la rifampicina), se repartieron en partes alícuotas y se conservaron a -20 °C.

2. OLIGONUCLEÓTIDOS

	Forward (Secuencia 5' → 3')	Reverse (Secuencia 5' → 3')
Oligonucleótidos para clonación en pSparkI		
Clo-NSH1	CCATGGTGAATTCTAATATCC	GTATGCTCCCTCCAGTATCTA
Clo-NSH2	TAGATAGAGAGGAGTTGGCAC T	CTGATCTGCTTCTCAAACAAG
Clo-NSH3	ATGAAGTTTTGTGTAGCTGTGG	TCATGAGGAATGTGGACG
Clo-NSH4	GAAAATACTGAAGTAGCGATC	GCAGTGTGTTATGTGAAGGA
Oligonucleótidos para clonación en pET30b+		
pET30-NSH1	GATGTCGACATGGCCTCGCAGG TGAACAGC	GGCGCCGCTCGGGTTTCATCACCAGCT C
pET30-NSH2	AGTTCTGGTCGACTGGCAGCCG ATACC	GCGGCCGCTGAAGAGTCCAAAAGG
pET40-NSH3	GATGTCGACCAACATCGTCGAA TTCTTTG	GCGGCCGCTGAGGAATGTGGACGACTC C
Oligonucleótidos para clonación en pXCS-HAStrep		
pXCS-NSH2	CTCAAGCTTATGGCAGCCGATAC C	CCCGGAGAGTCCAAAAGGCGAT
pXCS-NSH3	CCCCTCGAGATGAAGTTTTGTGT AGCTGTGGT	CCCGGTGAGGAATGTGGACGACTC
pXCS-NSH4	CCCATCGATATGATAGGTATGTG GACA	CCCGGTTTTGTGAGGATGACTCCAT
Oligonucleótidos para clonación en pET-His6-SUMO TEV LIC		
pET-SUMO-NSH3	TACTTCCAATCCAATGCACAAC ATCGTCGAATTCTTTG	TTATCCACTTCCAATGTTATTATCATGA GGAATGTGGACGACT

Oligonucleótidos para qRT-PCR

qACT	GCAATTCAGGCTGTCTTGTCTTT GT	TAAATCACGGCCAGCAAGATCC
qUBQ	TACATGCGATCTTGGACTGGC	GGGGCTTTTCTGGGTAGTCT
qNSH1	TTGGCAATGCAATGACGGAAG	GGCGTTCCACCCTTCAATGG
qNSH2	TGGCAACCAAAAATTTTCCTCCC	GTGACTTTCCCAGGATTAAGTTTTGC
qNSH3	TGTGTAGCTGTGGTATTGATTAT G	CAAAAGAATTCGACGATGTTGG
qNSH4	TGTGGACAGCAGTAGCAGTG	GAATCCGATGAGGCCTTCCC

Oligonucleótidos para clonación en pFGC5941

Sil-NSH1	GGTCTAGAGGCGCGCCGATCA AGGATTGAAAAATTGGAA	CCGGATCCATTTAAATCCATGGTGAAT TCTAATATCCA
Sil-NSH12	GGTCTAGAGGCGCGCCGATGAT AGCATGGCCATTTTGATGG	CCGGATCCATTTAAATTTTGTTAGTGGC CCAAGTGCTAG

3. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1 ESTIRPES BACTERIANAS

Durante el desarrollo de la tesis se han utilizado distintas estirpes bacterianas:

La cepa DH5 α F' de *E. coli* [*supE44*, *ΔlacU169*, (ϕ 80*lacZΔM15*), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] se empleó para clonaciones rutinarias. Esta estirpe está modificada genéticamente y carece de algunos componentes de su sistema de restricción y modificación, lo que la dota de gran utilidad para este tipo de aplicaciones.

La cepa BL21(DE3) de *E. coli* [*F- dcm ompT hsdS (r_B-m_B-) gal*] se caracteriza por su deficiencia en dos proteasas claves, por lo que se reduce la proteólisis de proteínas recombinantes. Además, el gen de la ARN polimerasa T7 se encuentra bajo el control de un promotor inducible por IPTG. Esta cepa resulta de gran interés para la expresión heteróloga de proteínas.

La cepa BL21(DE3) pLysS de *E. coli* [*ompT*, *hsdSB(r_B-m_B-)*, *dcm*, *gal*] contiene el plásmido pLysS, capaz de producir lisozima T7 que actúa reduciendo la expresión basal de la proteína de interés. Se utilizó para la expresión heteróloga de proteínas previamente clonadas en el plásmido pET-His6-SUMO TEV LIC (2ST).

Para la sobreexpresión de proteínas recombinantes y colocalización en *Nicotiana benthamiana* se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK (Koncz y Schell, 1986).

Para la inducción de raíces aéreas en *P. vulgaris* se utilizó la cepa K599 de *Agrobacterium rhizogenes*. Dicha cepa fue proporcionada por Estrada-Navarrete (México).

La cepa ISP14 (HUP⁻) de *Rhizobium leguminosarum*, se utilizó de forma rutinaria para la inducción de la nodulación en raíces de *P. vulgaris*. Dicha cepa fue proporcionada por CIFA-Las Torres (Sevilla).

Para la inducción de la nodulación en raíces transformadas de *P. vulgaris* se utilizó la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici*, proporcionada por Estrada-Navarrete (México). Se utilizó dicha cepa por su amplio rango de hospedadores con cultivos de judía andinos y mesoamericanos (Martinez- Romero et al., 1991).

3.3. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron semilla de judía de la variedad Great Northern (*P. vulgaris* L. cv. *Great Northern*) suministradas por el Profesor A. De Ron (Misión biológica de Galicia, CSIC, Pontevedra).

Para la expresión transitoria de proteínas recombinantes se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana*.

4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

4.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Las cepas de *E. coli* se cultivaron de manera rutinaria a 37 °C en medio LB esterilizado en el autoclave a 126 °C durante 20 min. Para los medios sólidos se añadió agar al 1,5 % (p:v), se esterilizó en el autoclave y se repartió en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro. En los casos en los que se añadió algún antibiótico, el medio se dejó enfriar hasta alcanzar los 50 °C para evitar la degradación del antibiótico.

Las distintas estirpes de *Agrobacterium* se cultivaron a 28 °C durante 48 h en medio LB.

Las estirpes de *Rhizobium* se cultivaron a 28 °C durante 16 h aproximadamente en medio para *Rhizobium*.

4.2-CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas se almacenaron a -80 °C en el mismo medio utilizado para su cultivo suplementado con glicerol estéril a una concentración final del 20 % (v:v).

5. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN

5.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. COLI*

A partir de las bacterias almacenadas en glicerol, se realizó un cultivo en una placa con el medio apropiado y se incubó a 37 °C durante 14-16 h. Con una de estas colonias se inocularon 4 ml de medio LB líquido y se cultivó a 37 °C, a 220 rpm durante 14-16 h. Posteriormente se inocularon 100 ml de medio LB fresco con 1 ml del cultivo y se incubó a 22 °C hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ de 0,5. Seguidamente, el cultivo se enfrió en hielo durante 5 min, y el resto del procedimiento se desarrolló a 4 °C. Las células se concentraron por centrifugación a 1.000 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 50 ml de tampón TB estéril. Se volvió a centrifugar 5 min a 1.000 g, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de tampón TB. Finalmente, se hicieron partes alícuotas de 100 µl que se enfriaron rápidamente en N líquido y se almacenaron a -80 °C.

5.2. TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE CÉLULAS DE *E. COLI*

Se mezclaron cuidadosamente 100 µl de células competentes de *E. coli* con el ADN y se incubaron en hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron a 42 °C durante 90 s y se enfriaron nuevamente en hielo durante 5 min. A continuación, se añadió 1 ml de LB y se incubó a 37 °C durante 1 h en agitación. Finalmente, se centrifugó a 500 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en 100 µl de LB, se sembraron en una placa con el medio selectivo apropiado, y se incubaron a 37 °C durante 14-16 h.

5.3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *AGROBACTERIUM*

A partir de un glicerol de *Agrobacterium*, se realizó un cultivo en una placa con el medio apropiado y se incubó a 28 °C durante 48 h. Con una de estas colonias se inocularon 4 ml de medio 2YT líquido y se incubó a 28 °C, a 220 rpm durante 14-16 h. Posteriormente, se inocularon 100 ml de medio 2YT fresco con 0,5 ml del cultivo y se incubó a 28 °C en agitación hasta que alcanzó una OD₆₀₀ de 0,5. Seguidamente, el cultivo se enfrió en hielo durante 5 min y el resto del procedimiento se desarrolló a 4 °C. Las células se concentraron por centrifugación a 1.000 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 12 ml de glicerol al 10 % estéril. Este proceso se repitió 3 veces reduciendo el volumen de glicerol a 4 ml, 2 ml y 1,5 ml, respectivamente. Finalmente, se

hicieron partes alícuotas de 100 µl que se enfriaron rápidamente en N líquido y se almacenaron a -80 °C.

5.4. TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN DE *AGROBACTERIUM*

Se mezclaron 50 µl de células competentes de *Agrobacterium* con aproximadamente 50 ng de ADN, y la mezcla se depositó en una cubeta de microelectroporación de 0,1 cm previamente enfriada a 4 °C. A continuación, la cubeta se sometió a un pulso de 2,5 kV en un sistema *Micropulser* (Bio-Rad), se añadió 1 ml de medio LB, se recogieron las células en un tubo estéril y se incubaron a 28 °C durante 2 h en agitación. Transcurrido este tiempo, las células se centrifugaron a 1.100 g durante 5 min y se desechó el sobrenadante. Finalmente, las células se resuspendieron en 100 µl de medio LB, se sembraron en una placa con el medio selectivo apropiado, y se incubó a 28 °C durante 48 h.

6. CONDICIONES DE CULTIVO DEL MATERIAL VEGETAL

6.1. CONDICIONES DE CULTIVO DE JUDÍA

Se utilizaron semilla de judía de la variedad Great Northern (*P. vulgaris L. cv. Great Northern*) suministradas por el Profesor A. De Ron (Misión biológica de Galicia, CSIC, Pontevedra). De manera rutinaria las semillas se esterilizaron mediante un lavado de 30 s en etanol absoluto, seguido de un lavado de 5 min con hipoclorito sódico al 0,2 % (p:v). Posteriormente, las semillas se lavaron 5 veces con agua destilada estéril para eliminar la solución anterior. Tras su esterilización, las semillas se colocaron en placas de Petri de 120 mm de diámetro sobre dos discos de papel de filtro humedecidos con agua destilada estéril. Las semillas se cubrieron con otros dos discos también humedecidos con agua destilada estéril. La humedad se mantuvo por adición regular de agua destilada estéril. Las placas se colocaron en la cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, a una temperatura de 26 °C en luz y 22 °C en oscuridad y una humedad constante del 70 %.

Para aquellos experimentos en los que se utilizaron tejidos de plantas adultas, las plántulas se sembraron al tercer día después de la imbibición en macetas de 16 cm de diámetro y 18 cm de altura que contenían perlita y vermiculita (1:2, p:p) y se mantuvieron en las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad que durante la germinación. En cada maceta se sembraron 3 semillas. En caso necesario, las plántulas se inocularon con la cepa ISP14 de *Rhizobium leguminosarum*, previamente cultivado a 28 °C durante menos de

30 h en un medio para *Rhizobium*. Las plantas se regaron tres veces por semana con solución nutritiva H&P.

6.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE *NICOTIANA BENTHAMIANA*

La semilla de *N. benthamiana* se sembraron en un sustrato compuesto de turba, fibra de madera (Lignofibre®C extrafina) y fibra de coco (Cocopeat Typ30) (90:5:5, p:p:p) (Gramosemi, Gramoflor), se regaron con agua, y se cultivaron en la cámara de cultivo en las mismas condiciones que las plantas de judía.

7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

Las secuencias de NSH se obtuvieron de *Phytozome* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), *TAIR* (<https://www.arabidopsis.org/>) y *NCBI* (National Center for Biotechnology Information (nih.gov)).

Para el análisis de secuencias y alineamientos se utilizó el paquete informático DNASTAR Lasergene Versión 7.0.0 y las aplicaciones Megalin, Seqman y Ediseq.

Para la elaboración de los árboles filogenéticos, las secuencias se analizaron con MUSCLE (Edgar, 2004) y el árbol filogenético se realizó con el software MEGA X (Kumar et al., 2018), utilizando el modelo *Neighbor-Joining* y tras realizar 1.000 réplicas de árboles para llevar a cabo el test de “bootstrapping” de cada secuencia (Felsenstein, 1985). Las secuencias alineadas fueron: *E. coli* Ybek (AAN79208); *E. coli* Yeik (AAA60514); *Crithidia fasciculata* (CFU43371); *Saccharomyces cerevisiae* (AF217406); *Synechococcus* (CP000239); *Trypanosoma vivax* (AF311701); *Volvox carteri* (Vocar0002s0393); *A. thaliana* AtNSH1 (At2g36310), AtNSH2 (At1g05620), ATNSH3 () y AtNSH4 (); *Cicer arietinum* NSH1 (Ca_00782), NSH2 (Ca_19997), NSH3 (XP_004508326.1) y NSH4 (XP_004486297.1); *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre06g271050); *Glycine max* NSH1.1 (XM014773909), NSH1.2 (Glyma.19G193700), NSH2.1 (Glyma.20g000200), NSH2.2 (Glyma.09 g285900), NSH3 (XP_003550523.1), NSH3.2 (XP_025980736.1) y NSH4 (XP_006594456.1); *Lotus japonicus* NSH1 (Lj1g0000699.1) y NSH2 (Lj2g0019610.1); *Medicago truncatula* NSH1 (Medtr07g104270), NSH2.1 (Medtr1g039400), NSH2.2 (Medtr1g039410), NSH3 (RHN64205.1) y NSH4 (RHN64206.1); *Nicotiana tabacum* NSH1 (XM_016656799) NSH2 (XM_016637716), NSH4.1 (XP_016511768) y NSH4.2 (XP_016465857.1); *Oryza sativa* NSH1.1 (Os08g44370), NSH1.2 (Os09g39440), NSH2 (Os03g31170), NSH4.1 (XP_015639913.1) y NSH4.2 (XP_015637724.1); *P. vulgaris* PvNSH1

(MW435747) PvNSH2 (MW435748), PvNSH3 (Phvul.006G159400) y PvNSH4 (Phvul.003G099100); *Physcomitrella patens* PpNRH1 (JQ649322), PpNRH2 (JX861385), PpNRH3 (JX861386), PpNRH4 (XP_024371258); *Populus trichocarpa* NSH1 (Potri.006g083400) NSH2 (Potri.007g144600), NSH4 (XP_002311814.2); *Solanum lycopersicum* NSH1 (Solyc09g009690) NSH2 (Solyc12g018990), NSH4.1 (XP_004229495.1), NSH4.2 (XP_004229486.1) NSH4.3 (XP4229485.1); *Triticum aestivum* NSH1.1 (Traes_7DS_DFF4A032D.1), NSH1.2 (Traes_1AS_FDC3AF8A2.1), y NSH2 (Traes_3AS_E563BAA68.1); *Vigna unguiculata* NSH1 (Vigun01g172400) y NSH2 (Vigun02g010300); *Zea mays* ZmNRH1a (HQ825159), ZmNRH1b (HQ825160), ZmNRH2a (HQ825161), ZmNRH2b (JQ594984), y ZmNRH3 (HQ825162); *Amborella trichopoda* (Amborell3; XP_011627997.2); *Quercus suber* (NSH4.1 (XP_023902382.1) y NSH4.2 (XP_023902377.1); *Selaginella moellendorffii* (Selaginella3; XP_024536907.1); *Theobroma cacao* NSH3 (EOY11262.1) y NSH4 (EOY06345.1); *Vitis vinifera* NSH4.1 (XP_010660033.1) y NSH4.2 (XP_010649815.1).

Los árboles filogenéticos se editaron con iTOLv4 (Letunic and Bork, 2019) y los logos de la secuencia se realizaron con Skylign (Wheeler et al., 2014).

La búsqueda de las secuencias de las proteínas apoplásticas se llevó a cabo con HMMER (<http://hmmer.org>) (Finn et al., 2011).

Para el análisis de las secuencias promotoras, se utilizó un fragmento de 1.000 pb situado corriente arriba del inicio de la traducción y se analizó mediante la base de datos *New PLACE* (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) (Higo et al., 1999).

La predicción de los péptidos señal de PvNSH3 y PvNSH4 se realizó con TargetP-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>) (Armenteros et al., 2019), y la de la localización subcelular con DeepLoc-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/cite.php>) (Armenteros et al., 2017).

8. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Para la extracción rutinaria de ADN plasmídico se partió de una colonia de *E. coli* *DH5α F'* transformada con el plásmido de interés, y con ella se inocularon 4 ml de LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes que se incubaron durante 14 h a 37 °C en agitación. Posteriormente, se centrifugaron 3 ml de este cultivo a 1000 g durante 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 200 µl de Solución I (ver apartado 1.1.1) y se incubó a temperatura

ambiente durante 5 min. A continuación, se añadieron 200 µl de Solución II (ver apartado 1.1.1) que provoca la rotura de células, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 200 µl de Solución III (ver apartado 1.1.1), se mezcló y se incubó en hielo durante 5 min. A continuación, se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Tras esto, se añadieron 500 µl de isopropanol, se mezcló vigorosamente y se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente con el fin de precipitar los ácidos nucleicos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 15 min a máxima velocidad y se eliminó el sobrenadante. La pella se lavó con etanol frío al 70 %, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Una vez la pella estuvo completamente seca, se añadieron 20 µl de H₂O mili-Q estéril y 2 µl de ARNasa 2 µg/µl y se incubó durante 20 min para eliminar el ARN. Posteriormente se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Para el aislamiento de ADN plasmídico de gran pureza se utilizó el kit comercial *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* (Favorgen, Taiwan) y se siguieron las instrucciones de la casa comercial.

9. SECUENCIACIÓN

La secuenciación de ADN bicatenario se realizó en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba, utilizando un secuenciador automático ABI3130 XL (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU).

10. AISLAMIENTO Y SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE TEJIDOS DE JUDÍA

10.1. EXTRACCIÓN DE ARN

Para la extracción de ARN total se tomaron 100 mg de tejido pulverizado y congelado a -80 °C y se mezclaron inmediatamente con el reactivo comercial NZYol Reagent (NZYTech, Portugal). Tras mezclarlo por agitación, se centrifugó a 16.000 g y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Seguidamente, se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 16.000 g durante 15 min a 4 °C. A continuación, se recogió la fase acuosa, se añadió 1 volumen de isopropanol, se mezcló, se incubó 15 min a temperatura ambiente, y se centrifugó a 16.000 g durante 10 min a 4 °C. Tras desechar el sobrenadante, se lavó la pella con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó nuevamente a 5.200 g durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, se desechó el sobrenadante, se dejó secar la pella durante unos minutos y se redisolvió en 0,2 ml de

H₂O mili-Q estéril. El ARN se precipitó nuevamente por adición de 132 µl de LiCl 8 M, se mezcló y se incubó durante 12 h a -20 °C. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 16.000 g durante 15 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se volvió a lavar la pella con etanol al 70 %. Finalmente, se dejó secar la pella y se redisolvió en 20 µl de H₂O mili-Q estéril.

10.2. SÍNTESIS DE ADNc

10.2.1. Tratamiento con ADNasa I y síntesis de ADNc

Para eliminar trazas de ADN genómico, el ARN se trató con ADNasa I antes de realizar la síntesis de ADNc. Para ello, 2 µg de ARN se trataron con 1 µl de ADNasa I (New England Biolabs, 2 U/µl), 1 µl de tampón de ADNasa (10X) y H₂O mili-Q estéril, en un volumen final de 10 µl, y se incubó a 37 °C durante 30 min. Seguidamente, se detuvo la reacción por adición de 1 µl de EDTA 50 mM e incubación a 65 °C durante 10 min. La ausencia de ADN se comprobó por PCR, utilizando como molde el ARN tratado con ADNasa I. Cada reacción contenía 1 µl de ARN tratado con ADNasa I, 4 µl de tampón de PCR (5x), 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl dNTPs 10 mM, 1 µl de oligonucleótido qACT y qACT, 0,2 µl (1 U) de Taq ADN polimerasa, y H₂O mili-Q hasta alcanzar un volumen de 20 µl. Las condiciones de PCR fueron: 2 min a 95 °C de desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 40 s a 72 °C, y una extensión final de 6 min a 72 °C. El resultado de la PCR se visualizó tras someterlo a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %.

Una vez comprobada la ausencia de ADN genómico en el ARN tratado, se procedió a la síntesis de ADNc. Para ello, se mezclaron 2 µg de ARN tratado con ADNasa I con 1 µl de *Random primer* 100 µM (Biotools) y 2 µl de H₂O mili-Q, y se incubaron a 65 °C durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 4 µl de *RevertAid Reaction Buffer* (Thermo Fisher Scientific), 2 µl de dNTPs 10 mM y 1 µl de retrotranscriptasa *RevertAid* (100 U/µl) (Thermo Fisher Scientific). La mezcla se incubó 10 min a 25 °C, 60 min a 42 °C y 15 min a 70 °C. La síntesis de ADNc se comprobó mediante PCR, en idénticas condiciones a las descritas anteriormente, salvo que se le añadió 1 µl de ADNc en vez del ARN tratado con ADNasa I. El ADNc se almacena a -20 °C hasta su uso.

10.3. FRACCIONAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS

10.3.1. Fraccionamiento de ADN

Para el fraccionamiento de ADN se llevó a cabo una electroforesis horizontal en geles de agarosa a la concentración adecuada según el tamaño del ADN a analizar y suplementados con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Las muestras se mezclaron con 0,2 volúmenes de solución de carga (6x) y el tampón de electroforesis fue TBE (1x). Como marcadores de peso molecular se utilizó el ADN del bacteriófago λ digerido con *EcoRI/HindIII* (Thermo Fisher Scientific) o el marcador Gene Ruler100 pb Ladder (Thermo Fisher Scientific). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V y posteriormente se visualizó el gel con un equipo Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad).

10.3.2. Fraccionamiento, cuantificación y determinación de la pureza e integridad del ARN

Para la cuantificación y determinación de la pureza del ARN se utilizó un espectrofotómetro NanoValue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

La pureza se determinó mediante dos parámetros: el cociente entre las absorbancias a 260 nm y a 280 nm y el cociente de la absorbancia a 260 nm frente a la de 230 nm.

Además, la integridad del ARN también se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p:v) en tampón TBE (0,5x). El ARN se mezcló con un volumen de tampón de carga de ARN, se calentó durante 5 min a 65 °C, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TBE pH 8 a una concentración de 0,5X. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V y posteriormente se visualizó el gel con un equipo Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad).

11. DIGESTIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Se utilizaron endonucleasas de restricción de las casas comerciales NE Biolabs y Thermo Fisher Scientific. Las digestiones se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales.

12. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN O VECTORES PLASMÍDICOS.

Las ligaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl. La concentración de ADN en la mezcla de ligación se intentó mantener en torno a 10-20 ng/µl. Se utilizó la siguiente

fórmula con el fin de calcular el número de microgramos de fragmento y vector en una relación molar 3:1 del fragmento a ligar respecto del vector:

$$X = 3x \frac{a \times b}{c}$$

X: microgramos del fragmento a ligar

a: tamaño (en pb) del fragmento a ligar

b: microgramos del vector

c: tamaño (en pb) del vector

Para llevar a cabo la ligación se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (2 U/μl) (Thermo Fisher Scientific) y se incubó a 16 °C durante 14-16 h.

12.1. CLONACIÓN INDEPENDIENTE DE LIGASA (LIC)

La clonación independiente de ligasa (LIC) utiliza la actividad exonucleasa (3' → 5') de la T4 ADN polimerasa para crear extremos solapantes de al menos 10-12 pb libres tanto en el inserto como en el plásmido, los cuales aparean y son reparados posteriormente por la actividad replicativa de la bacteria en la que se transforme. El plásmido pET-His6-SUMO-LIC se linealizó con 1 μl de la endonucleasa de restricción *SspI* (10 U/μl) (Thermo Fisher Scientific). Una vez linealizado, tanto el plásmido como los productos de PCR correspondientes al inserto se trataron con 1 μl de ADN polimerasa (5 U/μl) (Thermo Fisher Scientific) junto con 0,5 μl de los dexosinucleótidos dCTP, en el caso del inserto, y dGTP, para el plásmido. La adición de estos dNTPs detiene la actividad exonucleasa de la ADN polimerasa cuando alcanza a dicho dNTP. Dicha mezcla se incubó durante 30 min a 22 °C, tras lo que se detuvo la reacción por calentamiento a 75 °C durante 20 min. A continuación, se mezclaron el plásmido e inserto en una relación 3:1, se incubó durante 30 min a 22 °C, y se procedió a la transformación como se indica en el apartado 5.2.

13. AGROINFILTRACIÓN DE PLANTAS DE *N. BENTHAMIANA*

A partir de células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK almacenadas en glicerol y que contenían los plásmidos apropiados, se inocularon 4 ml de medio LB fresco suplementados con los antibióticos apropiados y se incubó a 28 °C a 220 rpm durante toda la noche. Al mismo tiempo se preparó un cultivo de *A. tumefaciens* C58C1 + pCH32, que porta el plásmido pBIN61-P19 que permite la expresión de P19, un supresor del silenciamiento (Qu y Morris, 2002). Transcurrido este tiempo, estos cultivos se utilizaron para inocular 50 ml de LB fresco suplementados con los antibióticos apropiados,

cuidando que la OD₆₀₀ inicial fuese de 0,1, y se incubaron a 28 °C y 220 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de entre 0,4-0,6. A continuación, los cultivos se centrifugaron a 1.000 g durante 15 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en tampón de infiltración de modo que la OD₆₀₀ fuese de 0,4, y se incubó 2 h en agitación a temperatura ambiente. Justo antes de la inoculación, se mezclaron volúmenes iguales de *A. tumefaciens* GV3101::pMP90RK transformado con el plásmido de interés y de *A. tumefaciens* C58C1 + pCH32 transformado con pBIN61-P19 y se infiltraron 2 o 3 hojas expandidas de plantas de *N. benthamiana* de 3-4 semanas de edad. La infiltración se realizó aplicando presión contra la cara abaxial de la hoja con una jeringa de 1 ml sin aguja. Una vez infiltradas, las plantas se trasladaron a la cámara de cultivo y se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 6.2 hasta el momento de la recolección de las hojas infiltradas.

14. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS A PARTIR DE TEJIDO VEGETAL

El tejido vegetal se recolectó, se pulverizó con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. En el momento de su análisis el tejido se mezcló con 4 volúmenes de tampón de extracción de proteínas (ver apartado 1.2.3), se incubó durante 5 min en hielo, se centrifugó a 16.000 g durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante.

15. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS

15.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida de concentración adecuada, utilizando una célula de electroforesis *Mini-Protean II Electrophoresis Cell* (BioRad, Hercules, CA, EE.UU). Para ello se mezclaron tres volúmenes de tampón de carga de Laemmli con un volumen de muestra y se cargaron en el gel previa desnaturalización por calentamiento a 95-100 °C durante 5 min. El tampón de electroforesis fue Tris-Glicina (1x) con SDS al 0,1 %.

Los geles se prepararon siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). El gel separador (ver apartado 1.1.4) se preparó al porcentaje requerido, se mezcló y se vertió en la célula de electroforesis. Para evitar la inhibición de la polimerización de la acrilamida por oxígeno, la parte del gel en contacto con el aire se cubrió con una capa de agua. Cuando el gel polimerizó, se eliminó el agua y se añadió el gel concentrador (ver apartado 1.1.4).

Finalmente, se colocó el peine para marcar los pocillos y se dejó polimerizar. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 200 V y a 4 °C.

Como marcador de peso molecular se utilizó la mezcla de marcadores *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) que cubren el rango de 10 kDa a 180 kDa.

16. TINCIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL

16.1. TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

Para visualizar las bandas de proteínas, los geles se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie R250:metanol:ácido acético:H₂O (0,1:40:10:50, p:v:v:v) durante 30 min en agitación suave, y se destiñeron con la misma solución, pero sin azul de Coomassie en agitación suave.

16.2. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

Cuando la cantidad de proteína a detectar fue muy baja, los geles se tiñeron con nitrato de plata utilizando el kit comercial *Silver Stain Plus* (Bio-Rad) y se siguieron las instrucciones de la casa comercial. Resumidamente, el gel se sumergió en 100 ml de la solución de fijación (50 % etanol, 40 % H₂O mili-Q y 10 % ácido acético; v:v:v) durante 40 min en agitación. Transcurrido este tiempo, el gel se lavó con una solución al 30 % de etanol durante 10 min, seguido de un lavado con 200 ml de H₂O mili-Q de 10 min. Posteriormente, el gel se incubó en 100 ml de la solución *Sensitizer* (1ml *ProteoSilver Sensitizer* y 99 ml de H₂O mili-Q) durante 10 min, seguido de un lavado con 200 ml de H₂O mili-Q durante 10 min. El gel se tiñó con una solución de plata (1 ml *Proteosilver Silver* y 99 ml de H₂O mili-Q) durante 10 min, y se lavó con 200 ml de H₂O mili-Q durante 1 min. Para el desarrollo de color de las proteínas presentes en el gel, este se sumergió en 100 ml de la solución *Developer solution* (5ml *Proteosilver Developer 1*, 0,1 ml *Proteosilver Developer 2* y 95 ml de H₂O mili-Q) en agitación hasta alcanzar la intensidad deseada, y se detuvo por adición de *Proteosilver Stop solution* e incubación durante 5 min. Por último, el gel se lavó con agua destilada.

17. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida hasta una membrana de PVDF (*polyvinylidene difluoride*, GE Healthcare). La transferencia se realizó en una célula *Mini-TRansBlot* (Bio-Rad) utilizando tampón de transferencia (ver apartado 1.2.10).

Tras la electroforesis, el gel se lavó con tampón de transferencia y se ensambló el sistema. Para ello, se colocó un soporte poroso sobre la placa catódica y, sobre este, dos trozos de papel *Whatmann 3 MM* con un tamaño similar al del gel, ambos humedecidos en tampón de transferencia. Sobre estos se depositó el gel, y sobre él la membrana de PVDF, previamente activada con metanol durante 1 min. Seguidamente, se depositaron otros dos trozos de papeles *Whatmann 3 MM* sobre la membrana y otro soporte poroso encima, todos saturados de tampón de transferencia, y se cerró el sistema con la placa anódica y evitando la formación de burbujas que podrían dificultar la transferencia de las proteínas del gel a la membrana. Para finalizar, la electrotransferencia se llevó a cabo tras introducir el conjunto en la cubeta de electroforesis, a 4 °C, y con una intensidad de corriente eléctrica constante de 300 mA durante 3 h.

Cuando finalizó la transferencia, se desmontó el sistema y se bloqueó la membrana en tampón TBS suplementado con leche desnatada en polvo al 8 % (p:v) y Tween 20 al 0,1 % durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, se lavó la membrana tres veces con tampón TBS suplementado con leche desnatada en polvo al 0,5 % (p:v) y Tween 20 al 0,1 % durante 5 min en agitación suave, y se dejó reaccionar con el anticuerpo primario diluido en solución de lavado durante toda la noche y en agitación suave a 4 °C. La membrana se volvió a lavar 3 veces con tampón TBS suplementado con leche desnatada en polvo al 4 % (p:v) y Tween 20 al 0,1 % para eliminar el anticuerpo no unido a la proteína diana, y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente. Se volvió a lavar la membrana para eliminar el anticuerpo secundario no unido y se procedió al revelado. Para ello, la membrana se cubrió con solución de revelado (ver apartado 1.1.5) durante el tiempo necesario para que se desarrollase el color púrpura. La reacción se detuvo mediante lavados sucesivos con agua destilada.

Como anticuerpos primarios se emplearon una dilución 1:3.000 de anti-His desarrollado en ratón (Sigma), una dilución 1:3.000 de anti-HA (Sigma) o una dilución 1:1.000 de antiNSH1 desarrollado en conejo.

Los anticuerpos secundarios fueron una dilución 1:10.000 de anti-inmunoglobulina de ratón desarrollado en cabra (para el anti-His) o en conejo (para los anti-HA y antiNSH1) conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma).

18. IDENTIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN NUCLEOSIDASAS DE *PHASEOLUS VULGARIS*

Para la identificación de los genes que codifican nucleosidasas en *Phaseolus vulgaris* se utilizaron como referencia los genes de *Arabidopsis thaliana* y se llevó a cabo un análisis mediante tBlastn en la base de datos *Phytozome* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Esta búsqueda nos permitió la identificación de cuatro secuencias con una alta similitud con los cinco genes descritos en *Arabidopsis thaliana* (AtNSH1-AtNSH5) (Jung et al., 2009) que se nombraron *PvNSH1*, *PvNSH2*, *PvNSH3* y *PvNSH4*, por su similitud con los de *Arabidopsis*. Se diseñaron oligonucleótidos específicos (clo-NSH1-F y clo-NSH1-R, clo-NSH2-F y clo-NSH2-R, clo-NSH3-F y clo-NSH3-R y clo-NSH4-F y clo-NSH4-R, para *PvNSH1*, *PvNSH2*, *PvNSH3* y *PvNSH4*, respectivamente) que se utilizaron para la amplificación mediante RT-PCR de los ADNc de cada uno de los genes. La mezcla de reacción de la PCR estaba compuesta por: 4 µl de tampón Hi-Fi, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada oligonucleótido 5 µM, 0,2 µl de Velocity DNA polimerasa (2 U/µl) (Bioline, Reino Unido), 2 µl de ADNc y H₂O mili-Q estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Las condiciones de la reacción de PCR se establecieron teniendo en cuenta las recomendaciones de la casa comercial de la DNA polimerasa y la T_m de los oligonucleótidos.

Los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa al 1 % y se purificaron con el kit comercial *NZYGelpure* (nzytech, Portugal). Posteriormente, se clonaron en el vector pSparkI (Canvax, España). El plásmido resultante se utilizó para transformar la estirpe DH5α F' de *E. coli*. Se aislaron plásmidos de varias colonias positivas que se analizaron mediante digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación.

19. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE *PVNSH1*, 2 Y 3 EN *E. COLI*

19.1. CLONACIÓN DE *PVNSH1*, 2 y 3 EN EL PLÁSMIDO PET30b(+)

Los marcos abiertos de lectura de los genes *PvNSH1*, *PvNSH2* y *PvNSH3* se amplificaron con los oligonucleótidos pET30-NSH1-*SalI* y pET30-NSH1-*NotI*, y pET30-NSH2-*SalI* y pET30-NSH2-*NotI*, y pET30-NSH3-*SalI* y pET30-NSH3-*NotI*, respectivamente. Estos oligonucleótidos contenían los primeros nucleótidos de la región codificante y los precedentes al codón de terminación, y un sitio de restricción para facilitar su clonación en fase en el vector pET30b(+). La mezcla de reacción de la PCR estaba compuesta por: 4 µl de tampón Hi-Fi, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada oligonucleótido 5 µM, 0,2 µl de Velocity DNA polimerasa (2 U/ul), 1 µl de los plásmidos (pSparkI-NSH1, pSparkI-

NSH2, pSparkI-NSH3) (20 ng/ μ l) y H₂O mili-Q estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de la reacción de PCR se establecieron teniendo en cuenta las recomendaciones de la casa comercial de la DNA polimerasa y la T_m de los oligonucleótidos.

Los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa al 1 %, se purificaron con el kit comercial *NZYGelpure* (nzytech, Portugal), y se clonaron en el vector pSparkI (Canvax, España) El plásmido resultante se utilizó para transformar la estirpe DH5 α F' de *E. coli*. Se aislaron plásmidos de varias colonias positivas, y se analizaron mediante digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación. Una vez comprobada la presencia del inserto apropiado y la ausencia de mutaciones, los plásmidos se digirieron con las endonucleasas de restricción *Sall* y *NotI*, y los insertos se clonaron en el vector pET30b(+) (Novagen), que añade una cola de 6 histidinas a ambos lados de la proteína recombinante. Con los plásmidos resultantes (pET-NSH1, pET-NSH2 y pET-NSH3) se transformó la estirpe BL21(DE3) de *E. coli*, se aislaron plásmidos de varias colonias positivas, y se analizaron mediante digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación.

19.2. CLONACIÓN DE *PvNSH3* EN PET-HIS6-SUMO-TEV

El ORF *PvNSH3* se amplificó por PCR del plásmido pXCS-NSH3 utilizando los oligonucleótidos pETSUMO-LIC-NSH3F y pETSUMO-LIC-NSH3R-STOP. Estos añaden una secuencia de nucleótidos complementaria que permite su clonación independiente de ligación en el vector pET-His6-SUMO-TEV-LIC. La mezcla de reacción de la PCR estaba compuesta por: 4 μ l de tampón Hi-Fi, 0,5 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de cada oligonucleótido 5 μ M, 0,2 μ l de Velocity DNA polimerasa (Bioline), 1 μ l de pXCS-NSH3 (20 ng/ μ l) y H₂O mili-Q estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 55 °C durante 2 min y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Tras purificar los productos de PCR, se llevó a cabo la ligación mediante el método LIC en pET-His6-SUMO TEV LIC. Con esta reacción se transformó la estirpe BL21 pLysS de *E. coli*. Se aislaron plásmidos de varias colonias positivas y se analizaron mediante digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación.

19.3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN NSH1-HIS, NSH2-HIS Y NSH3-HIS

A partir de células BL21(DE3) almacenadas en glicerol y que contenían los plásmidos pET-NSH1, pET-NSH2 y pET-NSH3 se realizaron cultivos en placa en el medio apropiado que se incubaron a 37 °C durante 14-16 h. Con una de estas colonias se inocularon 3 ml de LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml) y se incubó a 37 °C a 220 rpm durante 14-16 h. Con 1 ml de este cultivo se inocularon 50 ml de LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml) y se incubó a 37 °C a 200-250 rpm hasta que alcanzó una OD₆₀₀ de 0,5. Seguidamente se indujo la expresión de la proteína recombinante por adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 28 °C durante 6 h. Tras este tiempo, las bacterias se enfriaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 4.000 g durante 10 min a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las células se lisaron como se explica en el apartado 19.6 o se almacenaron a -80 C hasta su utilización.

19.4. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN HIS-SUMO-PVNSH3.

A partir de células *E. coli* BL21 (DE3) pLysS almacenadas en glicerol que contenían el plásmido pET-SUMO-NSH3 se realizaron cultivos en placa en el medio apropiado y se incubaron a 37 °C durante 14-16 h. Con una de estas colonias se inocularon 3 ml de LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y glucosa al 1 %, que bloquea la inducción basal de la proteína, y se incubó a 37 °C a 220 rpm durante 14-16 h. Con 1 ml de este cultivo se inocularon 50 ml de LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y glucosa al 1 %, y se incubó a 200-250 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,5. Seguidamente, se indujo la expresión de la proteína por adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 28 °C durante 6 h. Transcurrido este tiempo, las bacterias se enfriaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 4.000 g durante 10 min a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las células se lisaron o se almacenaron a -80 hasta su utilización.

19.5. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA NSFF

Un volumen apropiado de gel NSFF (*Niquel Sepharose Fast Flow*) (GE Healthcare) se transfirió a una columna, se dejó sedimentar y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se lavó con 5 volúmenes de H₂O mili-Q, se añadieron 0,5 volúmenes de NiSO₄ 0,1 M, se mezcló por inversión hasta que el gel se resuspendió, y se dejó sedimentar. Finalmente se

decantó el sobrenadante, se lavó la columna con 10 volúmenes de H₂O mili-Q y se equilibró con 1 volumen de tampón de inicio.

19.6. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN NSH1-HIS Y NSH2-HIS, NSH3-HIS Y HIS-SUMO-NSH3

pelleta pella de células obtenida tras la sobreexpresión se resuspendió en 10 ml de tampón de inicio (ver apartado 1.2.7) suplementado con 2,5 µl ADNasa (2 mg/ml), 5 µl ARNasa (1 mg/ml) y PMSF 0,5 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonio). Seguidamente, las células se lisaron por sonicación mediante 3 pulsos de 90 W durante 5 s en un equipo Vibra Cell (Sonic and Materials INC., Danbury, Connecticut, USA) manteniendo la muestra a 4 °C. El lisado se centrifugó a 5.000 g durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. Esta fracción soluble se transfirió a una columna de 1 ml de NSFF, previamente equilibrada con tampón de inicio, y se incubó con suave agitación durante 1 h. Transcurrido este tiempo, la columna se colocó en posición vertical, se dejó empaquetar el gel por gravedad, y se dejó fluir el extracto bacteriano. La columna se lavó con 10 volúmenes de tampón de inicio para eliminar las proteínas más débilmente unidas. Por último, la proteína recombinante se eluyó con 3 lavados de 5 volúmenes de columna cada uno de tampón de elución (ver apartado 1.2.7) que contenía imidazol 100, 300 y 500 mM, respectivamente), a pH 7,4.

19.7. REGENERACIÓN DE LA COLUMNA NSFF

Para regenerar la columna, esta se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM; pH 7,4. A continuación, se equilibró la columna por adición de 5 volúmenes de columna de tampón de inicio, seguido de 5 volúmenes de H₂O mili-Q.

20. PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos policlonales antiPvNSH1 fueron producidos por el Servicio Central de Experimentación Animal (SAEX, Universidad de Córdoba, España). Para ello, se mezclaron 200 µg de la proteína PvNSH1-His purificada con un volumen de adyuvante de Freund's y esta mezcla se le inyectó a conejos blancos New Zealand. Antes de la inmunización se extrajo un suero pre-inmune. 14 días después de la primera inmunización se repitió la inyección con 125 µg de la proteína, y esto se repitió mensualmente. 10 días después de cada inyección se le extrajo sangre al conejo para la extracción del antisuero. Los anticuerpos se enriquecieron y concentraron por precipitación con sulfato de amonio

y por cromatografía DEA-Sephacel (GE Healthcare, United States) con buffer fosfato 15 mM pH 7. Finalmente, los anticuerpos se repartieron en partes alícuotas y se conservaron a -20 °C.

21. EXPRESIÓN Y, PURIFICACIÓN DE PVNSH 2, 3 Y 4 EN *N. BENTHAMIANA*

21.1. CLONACIÓN EN EL PLÁSMIDO PXCS-HASTREP

Los marcos abiertos de lectura de los genes *PvNSH2*, 3 y 4 se amplificaron con los oligonucleótidos pXCS-NSH2-*HindIII* y pXCS-NSH2-*SmaI* para *PvNSH2*, pXCS-NSH3F-*XhoI* y pXCS-NSH3R-*SmaI* en el caso de *PvNSH3*, y pXCS-NSH4-*ClaI* y pXCS-NSH4-*SmaI* para *NSH4*, que añaden sitios de restricción que permiten su clonación en fase en el vector pXCS-HASTrep (Witte et al., 2004). La mezcla de reacción de la PCR estaba compuesta por: 4 µl de tampón Hi-Fi, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada oligonucleótido 5 µM, 0,2 µl de Velocity DNA polimerasa (2 U/µl), 1µl de los plásmidos pSparkI-NSH2, pSparkI-NSH3 o pSparkI-NSH4 (20 ng/µl) y H₂O mili-Q estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Las condiciones de la PCR se establecieron teniendo en cuenta las recomendaciones de la casa comercial de la DNA polimerasa y las T_m de los oligonucleótidos.

Los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa al 1 %, se purificaron con el kit comercial *NZYGelpure* (nzytech, Portugal), y se clonaron en el vector pSparkI (Canvax, España). Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar la estirpe DH5α F' de *E. coli*. Se aislaron plásmidos de varias colonias positivas, y se analizaron mediante digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación. Una vez comprobada la presencia del inserto apropiado y la ausencia de mutaciones, los plásmidos se digirieron con las endonucleasas de restricción *HindIII* y *SmaI*, para *PvNSH2*, *XhoI* y *SmaI*, para *PvNSH3*, y *ClaI* y *SmaI*, para *PvNSH4*, y los insertos se clonaron en el vector pXCS-HASTrep que permite la expresión de la proteína recombinante fusionada a un fragmento de la hemaglutinina (HA; YPYDVPDYA) y al octapéptido StrepII (WSHPQFEK). Con los plásmidos resultantes (pXCS-NSH2, pXCS-NSH3 y pXCS-NSH4) se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK (Koncz and Schell, 1986) mediante electroporación, se aislaron plásmidos de varias colonias positivas, y se analizaron mediante digestión con endonucleasas de restricción.

21.2. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN PVNSH2-HASTREP, PVNSH3-HASTREP Y PVNSH4-HASTREP

Las hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con la construcción adecuada se pulverizaron en nitrógeno líquido y se incubaron con cuatro volúmenes de tampón de extracción durante 5 min a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 20.000 g durante 10 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 100.000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a una columna con 200 µl de *Strep Tactin sepharose* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón de extracción, y se dejó fluir por gravedad. Seguidamente, se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado (ver apartado 1.2.9) y se eluyó la proteína recombinante con 200 µl del tampón de elución (ver apartado 1.2.9).

22. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ASOCIADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC/MS-MS)

Las proteínas se digirieron en solución tal y como se describe en Gómez-Baena y col. (2019). Brevemente, las proteínas se desnaturalizaron con el detergente *RapiGest* (Water Corporation) al 0,1 %, el cual es compatible con la espectrometría de masas, durante 10 min a 80 °C. A continuación, se redujeron los puentes disulfuro por incubación con DTT a una concentración final de 3 mM durante 10 min a 60 °C. Seguidamente, se bloquearon las cisteínas mediante la adición de yodoacetamida a una concentración final de 9 mM e incubación durante 30 min a 25 °C en oscuridad. Finalmente, se añadió tripsina a un ratio 50:1 (proteína:enzima) y se incubó toda la noche a 37 °C. Para detener la reacción proteolítica e inactivar y precipitar el detergente, se añadió TFA al 0,5 %. Dicha mezcla se incubó durante 45 min a 37 °C. Los posibles restos insolubles se eliminaron centrifugando dos veces a 13.000 g durante 15 min.

Tras la digestión, los péptidos se analizaron por cromatografía líquida en un sistema nano LC (Dionex Ultimate 3000 nano UPLC, Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas *Orbitrap Fusion* (Q-OT-qIT, Thermo Fisher Scientific). Los péptidos trípticos se cargaron en una precolumna *Acclaim Pepmap* (300 µm x 5 mm, Thermo Fisher Scientific) durante 5 min a un flujo de 5 µl/min, utilizando acetonitrilo al 2 % y TFA al 0,05 % como fase móvil. A continuación, los péptidos se separaron en una columna C18 *Acclaim Pepmap* (75 µm x 50 mm, Thermo Fisher Scientific) a 40 °C y un flujo de 300 nl/min. La separación se llevó a cabo durante 1 h, en un gradiente de ácido fórmico al 0,1 % en agua, como fase móvil A y acetonitrilo al 20 % y de ácido fórmico

al 0,1 % en agua, como fase móvil B. Las condiciones del gradiente fueron las siguientes: 0-120 min desde 4 al 35 % B; 120-126 min desde 35 a 55 % de B; 126-129 min, desde 55 a 90 % de B; 129-137 min, lavado al 90 % B; 137-152 min para reequilibrar la columna al 4 % de B.

Los péptidos eluidos se analizaron en un *Orbitrap Fusion* (Thermo, Scientific) operado en modo positivo y en el modo de adquisición dependiente de datos (DDA), seleccionando para su fragmentación los 40 iones más intensos en cada *scan*. El objetivo de recuento de iones AGC se estableció en 2×10^3 y el tiempo máximo de inyección en 300 ms. Los precursores se analizaron en el *Orbitrap*, en un rango de 400 a 1.500 m/z y a una resolución de 120 K (a 200 m/z) con un objetivo de recuento de iones de 4×10^5 . La selección de iones para fragmentación se realizó mediante aislamiento en el cuadrupolo a 1,2 Th. Para MS² solo se seleccionaron precursores con una carga comprendida entre 2 y 5, estableciendo una ventana de exclusión dinámica de 15 s, y permitiendo una tolerancia de 10 ppm para el precursor seleccionado. La fragmentación se realizó mediante disociación inducida por colisión (CID), a una energía de colisión normalizada de 35. Los fragmentos se analizaron en la trampa de iones.

Las proteínas se identificaron y cuantificaron utilizando el programa Peaks X (Bioinformatics Solution). Los parámetros para la identificación de péptidos fueron los siguientes: tripsina como proteasa, se permitieron dos errores de corte, carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, y oxidación de metionina como modificación variable.

Para la identificación de las proteínas se utilizó una base de datos combinada que contenía todas las proteínas predichas a partir del genoma de *N. benthamiana* (descargado de https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_benthamiana/genome el 30 de octubre de 2020, y que contenía 76.379 entradas) y la secuencia de NSH2 de *P. vulgaris*. Los parámetros para la identificación de proteínas fueron los siguientes: tolerancia de error de 10 ppm con respecto a la masa del precursor, tolerancia de los iones producto en 0,5 Da, y un *false discovery rate* (FDR al 1 % a nivel de péptido).

23. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NUCLEOSIDASA

La actividad nucleosidasa se determinó siguiendo la hidrólisis de los nucleósidos mediante HPLC. Para los ensayos de actividad nucleosidasa citosólica, se mezcló una cantidad apropiada de enzima purificada o del extracto crudo con el tampón de reacción

(Tris-HCl 50 mM, DTT 1 mM, sustrato 2 mM) a pH 7,5 y se incubó a 40 °C durante 40 min. Para la determinación de la actividad apoplástica se procedió de manera similar, pero utilizando Succinato 50 mM a pH 5 en lugar de Tris-HCl e incubando 2 h a la misma temperatura. Transcurrido el tiempo de ensayo, la reacción se detuvo por hervido durante 5 min, y por adición de ácido perclórico a una concentración final de 0,5 M y su posterior neutralización con KOH a la misma concentración. Seguidamente, se eliminó el precipitado proteico por centrifugación a 16.000 g durante 5 min a 4 °C. Se utilizaron 20 µl de esta reacción para el análisis mediante HPLC.

El sistema de HPLC constó de una bomba Jasco PU 2089 (Jasco, Tokio, Japón) con un autoinyector Jasco AS-2055 Plus que posee un bucle de 100 µl, y un detector de matriz de diodos (*diodo-array*) Jasco MD-2010 Plus. El conjunto del sistema se controló con el paquete informático Jasco Borwin 1.5 (Jasco, Tokio, Japón). Se utilizó una columna de fase reversa Chromolit Performance RP-18e (100-4,6 mm). Como fase móvil se utilizó acetato amónico 50 mM (pH 5,2) y metanol al 0,5 % (v:v) para uridina-uracilo y citidina-citosina, 1 % (v:v) para xantosina-xantina, inosina-hipoxantina y guanosina-guanina, 2 % (v:v) para timidina-timina y 5 % (v:v) para adenosina-adenina, a un flujo constante de 1 ml/min. Los nucleósidos y nucleobases se detectaron a 254 nm.

24. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NUCLEASA

La actividad degradadora de ADN de cadena sencilla (ADNss) se ensayó en extractos crudos determinando la liberación de nucleótidos solubles en ácido de ADNss como describe Wood y col. (1998) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contuvo TES 50 mM (pH 5,5), BSA (1 mg/ml), ADN de testículo de salmón (0,5 mg/ml) previamente hervido durante 10 min, y una cantidad adecuada de extracto crudo. La mezcla se incubó a 35 °C, y se extrajeron partes alícuotas de 0,3 ml que se mezclaron con 1 ml de ácido perclórico al 3,4% (v:v). Tras homogeneizar, la mezcla se centrifugó a 16,000 g durante 15 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se determinó su A_{260} . Una unidad de actividad nucleasa se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de $A_{260} = 0,01 \text{ min}^{-1}$ (Yupsanis et al., 2004).

25. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MEDIANTE RT-PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

Los análisis de expresión génica se llevaron a cabo por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en un sistema iCycler iQ (Bio-Rad), utilizando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad).

La mezcla de reacción contenía 1 µl cDNA (diluido 1:5), 0,8 µl de los oligonucleótidos específicos 5 µM, 7,5 µl de iTaq SYBR-Green Supermix (Bio-Rad) y 5,7 µl de H₂O. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C. Para comprobar la especificidad de la reacción, tras el último ciclo se realizó una curva de fusión sobre un rango de temperatura de 60-100 °C con incrementos de 0,5 °C.

Los resultados se normalizaron utilizando la media geométrica de la expresión de los genes de referencia *actina-2* (gene ID. EU369189) y *ubiquitina* (gene ID. XM_007145751), y se calcularon aplicando el método $2^{-\Delta CT} / 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001), donde Ct es el punto en el que la fluorescencia aumenta apreciablemente sobre el ruido de fondo. La especificidad de los oligonucleótidos se comprobó mediante RT-PCR, la secuenciación de los amplicones, y siguiendo sus curvas de disociación.

26. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

26.1 DETERMINACIÓN DE UREIDOS

Para analizar el contenido de ureidos en extractos de plantas se utilizó el método colorimétrico descrito por Vogels y Van der Drift (1970). El método consiste en la determinación del glioxilato formado químicamente a partir de sus derivados alantoína y alantoato. Para ello, una cantidad adecuada de extracto crudo se llevó hasta 1 ml de agua. A esta mezcla se le añadieron 0,2 ml de tampón fosfato sódico 0,4 M (pH 7) y 0,2 ml de fenilhidrazina-HCl 22,8 mM y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadieron 1 ml de HCl 12 N a 4 °C y 0,2 ml de K₃[Fe(CN)₆] 48,6 mM y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente se determinó la A₅₂₀.

Por otro lado, se determinó la concentración de alantoato a través de su transformación en glioxilato. Para ello, se tomó una cantidad determinada de extracto y se llevó a un volumen final de 0,8 ml con agua destilada. A dicha mezcla se le añadieron 0,2 ml de

HCl 0,15 N y se incubó a 100 °C durante 10 min. Seguidamente, las muestras se enfriaron en agua a 4 °C y se determinó el glioxilato midiendo la A_{520} .

Por último, se determinó la cantidad de alantoína presente en los extractos. Para ello, una cantidad adecuada de extracto se llevó hasta un volumen final de 0,6 ml con agua destilada. A esta mezcla se le añadieron 0,2 ml de NaOH 0,5 M y se incubó a 100 °C durante 10 min, transformando así la alantoína en alantoato. Seguidamente las muestras se enfriaron en agua helada a 4 °C y se añadieron 0,2 ml de HCl 0,65 N. Dicha mezcla se volvió a incubar a 100 °C durante 10 min, permitiendo la transformación del alantoato en glioxilato. Finalmente, la mezcla se enfrió a 4 °C y se determinó la A_{520} .

26.2 ANÁLISIS DE NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA ASOCIADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS)

El análisis de nucleósidos y nucleobases en tejidos de judía se llevó a cabo mediante un cromatógrafo líquido de ultra resolución Acquity (Waters, Estados Unidos) acoplado a un espectrómetro de masas QTRAP 5500 de triple cuadrupolo (AB SCIEX, Estados Unidos) y controlado con el software Analyst 1.6.2 (AB SCIEX, Estados Unidos). Los nucleósidos y nucleobases se separaron en una columna Kinetex C18 (150 x 2,10 mm, 5 μ m, 100 Å) (Phenomenex, Estados Unidos). Las fases móviles fueron A: 0,01 % (v:v) de ácido fórmico en agua y B: metanol. Los catorce compuestos se separaron con el siguiente gradiente: 2 % B durante 2 min, un gradiente lineal hasta el 50 % B en 3 min, aumento a 100 % B durante 2 min, vuelta a las condiciones iniciales en 0,1 min y se dejó equilibrando durante 5 min antes de la siguiente inyección. El flujo de la columna fue de 250 μ l/ min, el volumen de inyección de 2 μ l y la temperatura 35 °C.

La detección MS se operó en modo de ionización positiva por electrospray y monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se seleccionaron los iones precursores $(M + H)^+$ para los 14 compuestos analizados. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y el gas de colisión. Los parámetros de la fuente de ionización fueron idénticos para todos los compuestos: el voltaje fue 5.500 V, la temperatura 400 °C y las presiones de los gases (N_2), el gas fuente de iones (GC1), y el turbo gas (GS2) se establecieron en 40, 50 y 50 psi, respectivamente. La transición para los iones cuantificados mediante MRM, el potencial óptimo final de desagrupamiento (DP), y la energía de colisión (CE) que proporcionaron la intensidad máxima de la señal se recogen en la Tabla 1a. Los nucleósidos y nucleobases se extrajeron añadiendo 5 ml de agua hirviendo a 50 mg de tejido en polvo congelado. Tras hervir

durante 10 min, la mezcla se incubó durante 15 min en un baño de ultrasonidos y se centrifugó a 250.000 g durante 1 h a 4 °C. Las muestras se diluyeron 20 veces antes de las determinaciones. La solución madre de estándares de cada analito se preparó en agua. Los patrones de calibrado se prepararon en el momento y por dilución de la solución madre con la fase móvil. Las concentraciones de los patrones de calibrado variaron de 0,6 a 12 ng/ml (cinco concentraciones), excepto para la adenosina y guanósina que variaron de 2,4 a 120 ng/ml (seis concentraciones). Tras su preparación, los patrones se inyectaron inmediatamente utilizando un autoinyector automático refrigerado a 10 °C.

Las regresiones lineales de los 14 compuestos mostraron un coeficiente de correlación (r^2) de 0,9950 a 0,9998. Los límites de cuantificación (LOQ) para cada analito se determinaron a una relación señal/línea base (Signal/Noise) de aproximadamente 10 (Tabla 1b).

La precisión del método desarrollado se determinó mediante una prueba de recuperación. Para ello, se mezclaron cantidades conocidas de los 14 estándares en una cierta cantidad de tejido triturado de judía. A continuación, se extrajeron tres réplicas de las muestras tomadas y se analizaron como se ha descrito anteriormente. Para calcular las cantidades detectadas (reales), se comparó la señal en ausencia y presencia del estándar correspondiente. Las recuperaciones promedio se calcularon en base a la relación entre la cantidad detectada (real) y la cantidad máxima (teórica). Las recuperaciones generales estuvieron entre el 86 y el 103 %, con una desviación estándar relativa (RSD) inferior al 10 %.

Tabla 1. Detección de compuestos mediante el método LC-MS y límites de cuantificación (LOQ)

a) Parámetros espectrométricos de masas optimizados y tiempo de retención (R_t) para los compuestos analizados.

Metabolito	Fórmula	Masa teórica (g mol ⁻¹)	Ion Precursor (m/z)	Productos de iones (m/z)	DP (V)	CE (V)	R_t (min)
Xantosina	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	284.228	285.1	153.1 133.2	21	15 15	5.75
Inosina	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	268.226	269.1	137.1 110.1	51	25 55	5.34
Guanosina	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	283.241	284.1	152.1 110.1	76	23 57	5.43
Adenosina	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	267.241	268.1	136.1 92	96	23 73	5.69

Uridina	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	244.201	245	112.9 70	66	19 47	3.16
Timidina	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	242.229	243.1	127.1 117.1	56	17 17	5.88
Citidina	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	243.220	244.1	112.1 95	41	27 59	1.57
Guanina	C ₅ H ₅ N ₅ O	151.126	152	135 110	56	25 27	2.08
Uracilo	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	112.087	113	70 96.1	106	21 23	1.9
Citosina	C ₄ H ₅ N ₃ O	111.102	112	95.1 52	76	23 41	1.17
Xantina	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	152.111	153	110.1 136.1	101	25 19	3.00
Hipoxantina	C ₅ H ₄ N ₄ O	136.111	137	118.9 110	46	29 31	2.61
Adenina	C ₅ H ₅ N ₅	135.127	136	109 119.1	111	33 29	1.88
Timina	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	126.113	127	109.8 56.1	66	21 29	3.90

DP: potencial óptimo final de desagrupamiento; CE: energía de colisión

b) Límite de cuantificación (LOQ) de los compuestos analizados.

Nucleósidos		Bases nitrogenadas	
Analitos	LOQ (ng mL ⁻¹)	Analitos	LOQ (ng mL ⁻¹)
Xantosina	0.495	Xantina	0.780
Inosina	0.890	Hipoxantina	0,517
Guanosina	1.253	Guanina	0.353
Adenosina	1.987	Adenina	0.367
Uridina	0.817	Uracilo	1.500
Timidina	2.197	Timina	1.063
Citidina	0.203	Citosina	0,123

27. EXTRACCIÓN DE FLUIDO APOPLÁSTICO DE RADÍCULAS DE JUDÍA

El fluido apoplástico se extrajo de radículas procedentes de unas 80 semillas tras 5 días después del inicio de la imbibición. Estas se cortaron en fragmentos de 1 cm y se sumergieron en tampón K₂HPO₄ 20 mM suplementado con PMSF 0,5 mM a 4°C. Seguidamente, se sumergieron en tampón de infiltración (KCl 200 mM, MES 10 mM) y

se aplicaron 3 pulsos de vacío (-0,1 MPa) durante 15 min, dejando 10 min de reposo entre cada pulso. A continuación, las raíces se secaron con papel de filtro, se introdujeron en una jeringa de 10 ml a la que se le había retirado el émbolo, y esta se introdujo a su vez en un tubo de 50 ml. El sistema se centrifugó a 1.000 g durante 15 min a 4 °C en un rotor basculante, tras lo cual, se recogió el fluido en un tubo nuevo y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

28. OBTENCIÓN DE PLANTAS QUIMÉRICAS DE JUDÍA CON RAÍCES QUE PRESENTAN ALTERADA LA EXPRESIÓN DEL GEN *PvNSH1*

28.1. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES BINARIOS PARA EL SILENCIAMIENTO DE *PvNSH1*

Se diseñaron vectores binarios derivados del plásmido pFGC5941 (AY310901). Este plásmido contiene un sitio de clonación múltiple a cada lado del intrón 1 del gen de la chalcona sintasa A de *Petunia hybrida* (CHSA) que permite la clonación del fragmento del gen a silenciar en dirección sentido y antisentido respectivamente, lo que permite la formación de una horquilla de ARN bicatenario.

Se construyeron dos plásmidos, pFGC-SilNSH1 (ARNi-sil1) y pFGC-SilNSH12 (ARNi-sil12) (Figura 4). El primero contenía un fragmento de 281 nucleótidos situado entre las posiciones 1.028 y 1.308 del ADNc *PvNSH1*, y que incluía 155 nucleótidos de la región 3'UTR de *PvNSH1*. El segundo, contenía un fragmento de 351 nucleótidos situado entre las posiciones 237 y 588 del ADNc *PvNSH1*, todos ellos correspondientes a la región codificante de *PvNSH1*. Dichos fragmentos se amplificaron mediante PCR sobre ADNc de nódulos de judía utilizando los oligonucleótidos SilPvNSH1-F y Sil PvNSH1-R, y SilPvNSH12-F y Sil PvNSH12-R, respectivamente. Los oligonucleótidos F permitían la adición de sitios de restricción *Xba*I y *Asc*I, mientras que los R, añadieron sitios de restricción *Bam*HI y *Swa*I, lo que permitió la clonación de dichos fragmentos en dirección sentido y antisentido a ambos lados del intrón *chsA*, respectivamente.

Tras verificar las construcciones por secuenciación, estas se utilizaron para transformar la cepa K599 de *Agrobacterium rhizogenes* mediante electroporación (ver apartado 5.4).

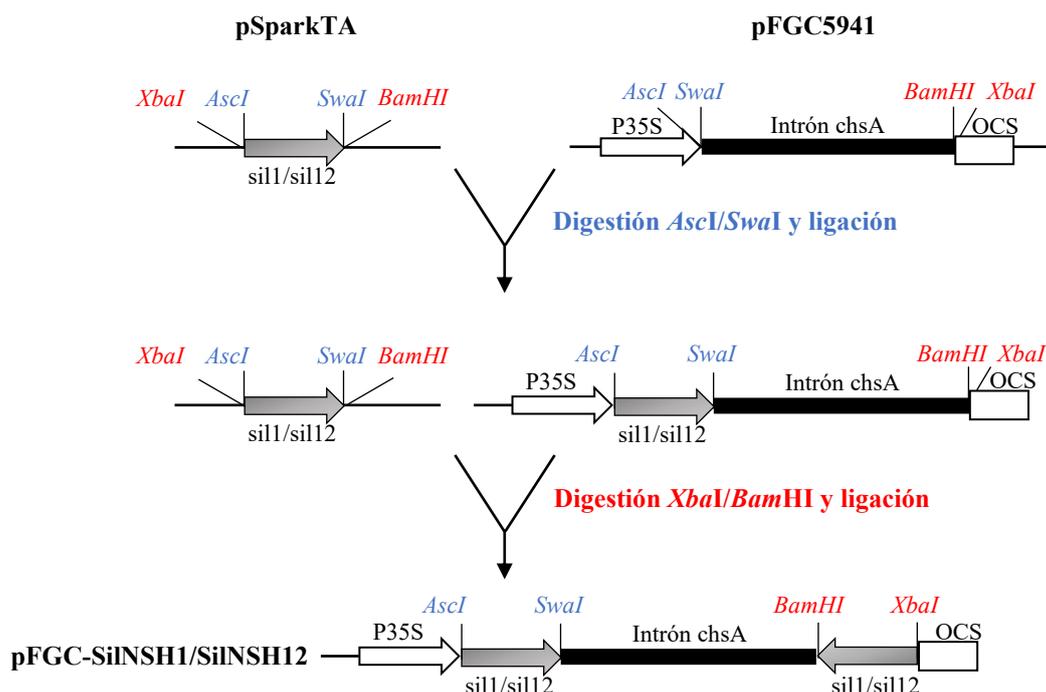


Figura 4. Representación esquemática de la construcción de los plásmidos pFGC-SilNSH1 y pFGC-SilNSH12. Se indican las enzimas de restricción utilizadas para la clonación. P35S: promotor 35S; OCS: terminador OCS; sil1: fragmento sil1; sil12: fragmento sil12.

28.2. TRANSFORMACIÓN DE PLÁNTULAS DE JUDÍA Y GENERACIÓN DE RAÍCES TRANSFORMADAS

Las plántulas de judía se transformaron siguiendo la metodología propuesta por Estrada-Navarrete y col. (2007) y Nanjareddy y col. (2017) con modificaciones.

La transformación de plantas de judía se llevó a cabo con plántulas de judía tras 3-4 días después del inicio de la imbibición, cuando la radícula comenzó a desarrollarse. Dos días antes de la transformación, se realizó un cultivo en placa con LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml) de *Agrobacterium rhizogenes* K599 transformado con los plásmidos de interés (pFGC5941, pFGC-SilNSH1 o pFGC-SilNSH12) a partir de las bacterias almacenadas en glicerol.

Para la transformación, se recogió el cultivo de la placa de *A. rhizogenes* y se resuspendió en 1 ml de H₂O mili-Q estéril suplementado con acetosiringona 100 µM. A continuación, se inyectaron algunos microlitros de esta solución en la zona del gancho del hipocótilo, utilizando una jeringa de 1 ml y asegurando que la aguja alcanzase el tejido vascular (Figura 5A). Seguidamente, las radículas de las plántulas infectadas se introdujeron a través de una cubierta de papel de aluminio que se había colocado sobre tubos de 15 ml

con solución nutritiva B&D, los cuales se introdujeron a su vez en tubos de cultivo de 22 cm (Figura 5B). El sistema se colocó en la cámara de cultivo en las condiciones habituales. Tras 5-7 días se observó la aparición de callos, y poco más tarde aparecieron las primeras raíces (Figura 5C). Tras unos 14 días se cortaron las raíces principales (Figura 5D, E), se trasplantaron las plántulas a macetas con vermiculita estéril (humedecida con solución B&D suplementada con 2 mM de KNO_3 , para facilitar la nodulación) (Figura 5F), y se inocularon con *Rhizobium tropici* CIAT899. La inoculación con *R. tropici* se repitió 7 días más tarde. Las plantas se cultivaron durante 28 d, regando de forma regular con solución nutritiva B&D. Transcurrido este tiempo, se recogieron los nódulos, raíces y hojas y se conservaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

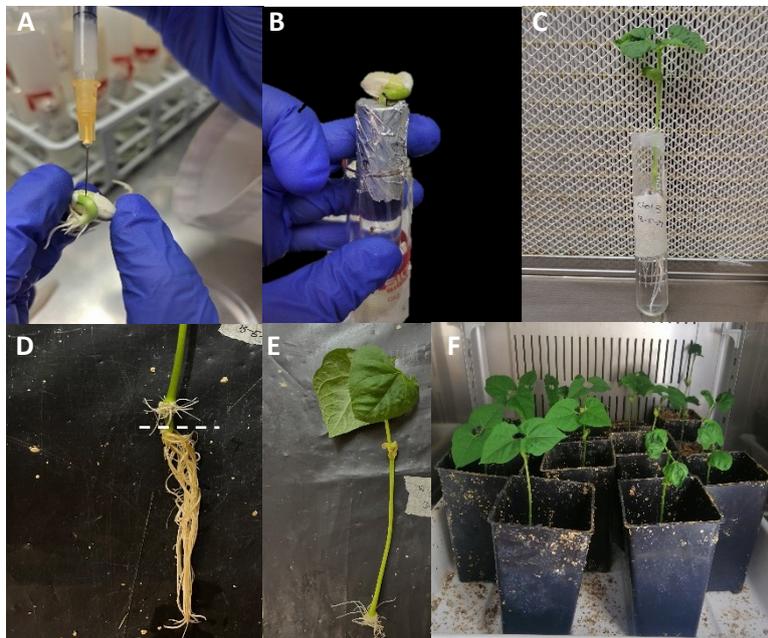
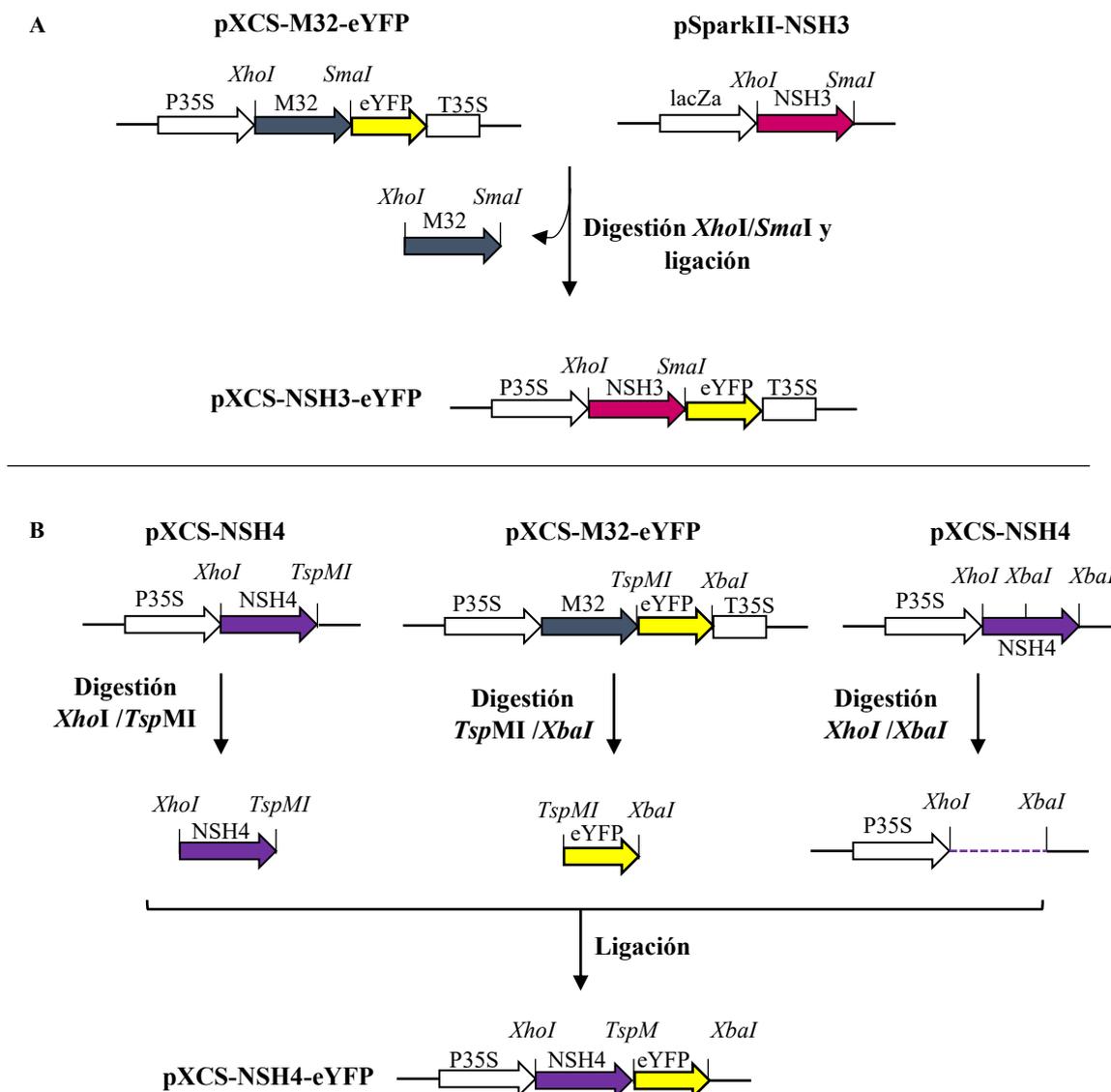


Figura 5. Raíces aéreas de judía transformadas con *A. rhizogenes*. (A) Inyección del hipocótilo de semillas de judía con *A. rhizogenes*, (B, C) montaje en tubos de las semillas infectadas, (D, E) corte de las raíces principales (F) trasplante de las plantas transformadas a maceta.

29. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS PVNSH3 Y PVNSH4

Para la localización subcelular de PvNSH3 y 4 se realizaron construcciones con los ORFs de dichos genes fusionados traduccionalmente a eYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) y bajo el control del promotor 35S.

Para la localización subcelular de PvNSH3 se partió de los plásmidos pXCS-M32-eYFP (Gálvez-Valdivieso et al., no publicado) y pXCS-NSH3. Estos se digirieron con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *SmaI*, lo que permitió liberar el ORF de *PvNSH3* y el fragmento M32 y dejar extremos *XhoI* y *SmaI* en el plásmido resultante, pXCS-eYFP. Tras su purificación, el ORF *PvNSH3* se clonó en el vector pXCS-eYFP, dando lugar al plásmido pXCS-NSH3-eYFP (Figura 6A).



Para la localización subcelular de PvNSH4, se partió del plásmido pXCS-NSH4 que se digirió por un lado con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *TspMI*, liberando el ORF de *PvNSH4* y, por otro lado, con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *XbaI*, liberando el plásmido pXCS. Por otro lado, el plásmido pXCS-M32-eYFP se digirió con las endonucleasas de restricción *TspMI* y *XbaI*, lo que liberó en fragmento eYFP. Tras su purificación, los fragmentos PvNSH4, eYFP y pXCS se mezclaron y se ligaron, dando lugar al plásmido pXCS-NSH4-eYFP (Figura 6B).

Las construcciones pXCS-NSH3-eYFP y pXCS-NSH4-eYFP se utilizaron para transformar la estirpe DH5 α F' de *E. coli* y, tras comprobar la ausencia de mutaciones por secuenciación, se transformaron células de *A. tumefaciens* GV3101::pMP90RK.

Como control de localización se utilizaron construcciones que contenían las proteínas AT5G11420, una proteína localizada en el apoplasto, RPP3A (AT4G25890.1), una proteína de localización citosólica, ambas fusionadas traduccionalmente a mCherry (Stoddard y Rolland, 2018), y la proteína AtPIP2A, que se localiza en la membrana plasmática, también fusionada traduccionalmente a mCherry (Nelson et al., 2007).

Las células de *A. tumefaciens* transformadas con las correspondientes construcciones se utilizaron para agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana*. Transcurridos 2, 3 y 4 días tras la infiltración, se recogieron fragmentos de 1 cm² aproximadamente de las hojas infiltradas, que se depositaron sobre un portaobjetos con el lado abaxial hacia arriba, se cubrieron con una gota de agua destilada, y sobre ella se colocó un cubreobjetos. Los discos se observaron con un microscopio confocal Axioskop (Carl Zeiss Inc., Jena GmbH, Alemania) equipado con un láser de criptón y otro de argón, controlado por el software Carl Zeiss Laser Scanning System LSM5 PASCAL (Carl Zeiss Inc.). Las proteínas PvNSH3 y PvNSH4 fusionadas a eYFP se excitaron con la línea láser Ar de 514 nm y se detectaron en la ventana de 530 a 620 nm. Los controles de localización apoplástica, citosólica y de membrana plasmática fusionados a m-Cherry se excitaron con la línea laser de 568 nm y se detectaron en la ventana de 580 a 620 nm. Los datos del microscopio se registraron y luego se transfirieron para su análisis al software Zeiss LSM Image Browser versión 4.0 (Carl Zeiss INC.).

V. RESULTADOS

**CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS PVNSH1 Y
PVNSH2 DE JUDÍA**

1.1. Clonación y caracterización de las secuencias de las nucleosidasas *PvNSH1* y *PvNSH2* de judía

Para identificar y clonar los ADNc que codifican nucleosidasas citosólicas de judía se realizó un análisis mediante *tBLASTn* en la base de datos *Phytozome* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) utilizando la secuencia de NSH1 de *Arabidopsis thaliana*. Dicho análisis permitió identificar dos secuencias que codifican posibles nucleosidasas (NSHs) en *Phaseolus vulgaris* (Phvul.001G188700 y Phvul.003G000600). A partir de estas secuencias, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Materiales y Métodos 2) que se utilizaron para la amplificación mediante RT-PCR de los ADNc de ambos genes, que tras su clonación y secuenciación se denominaron *PvNSH1* y *PvNSH2* debido a la similitud con las nucleosidasas de *Arabidopsis AtNSH1* y 2 (Tabla2). Para *PvNSH1*, la secuencia nucleotídica correspondientes al mayor marco abierto de lectura (ORF) fue de 1.005 pb, lo que codifica un polipéptido de 334 aminoácidos con una masa molecular predicha de 35,7 kDa, mientras que para *PvNSH2* el mayor ORF fue de 972 pb, lo que codifica un polipéptido de 323 aminoácidos con una masa molecular predicha de 34,6 kDa. Ambas nucleosidasas presentan una similitud del 51,6 % entre ellas (Tabla 2). Como en todas las nucleosidasas de plantas identificadas, *PvNSH1* y 2 conservan un dominio rico en aspartato en el extremo N-terminal (DTDPGIDD; Versees y Steyaert, 2003). De estos residuos, los Asp situados en las posiciones 27, 32-0 y 259 (anotado según *PvNSH1*) son importantes en todas las nucleosidasas para la coordinación con un átomo de Ca^{2+} presente en el centro activo, y el Asp 31 interviene en la unión al grupo 2-OH de la ribosa (Kopečna et al., 2013). Además, tanto *PvNSH1* como *PvNSH2* conservan otros aminoácidos como los Asp-250 y Trp-245 o Tyr-250 y Tyr-245, respectivamente, que son importantes para determinar la especificidad de sustrato (Figura 7A).

El análisis filogenético mostró que las nucleosidasas de plantas se dividen en dos clados (Figura 7B). *PvNSH1* pertenece al clado II, que comprenden mayoritariamente a la subclase II, en la que se agrupan las nucleosidasas que presentan un Asp-250 y un Trp-245 (anotado según *PvNSH1*), las cuales presentan mayor afinidad por uridina y xantosina. Por otro lado, *PvNSH2* pertenece al clado I, que incluye a las nucleosidasas de la subclase Ia, las cuales contienen Tyr-245 y Tyr-250 (anotado según *PvNSH1*) y que tienen más afinidad por xantosina e inosina (Kopečna et al., 2013). Dentro del clado II hay tres secuencias, *Zea mays* ZmNRH3, *T. aestivum* NSH1.2, y *O. sativa* NSH1.2, que contienen Tyr-245 y Tyr-250 en lugar de Asp-250 y Trp-245, pero prefieren xantosina e

inosina, por lo que pertenecen funcionalmente a la subclase Ib. PvNSH1 y PvNSH2 comparten el 70-90 % de su secuencia con NSHs de plantas agrupadas en el mismo clado y alrededor del 50 % con las NSHs de otras ramas (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de similitud de PvNSH1 y PvNSH2 con otras NSHs de plantas.

	PvNSH1	PvNSH2
PvNSH1	-	51,6
PvNSH2	51,6	-
AtNHS1	75,1	50,3
AtNSH2	53,0	77,6
<i>C. arietinum</i> NSH1	82,0	49,7
<i>C. arietinum</i> NSH2	50,8	87,0
<i>G. max</i> NSH1.1	87,3	56,4
<i>G. max</i> NSH1.2	87,9	52,3
<i>G. max</i> NSH2.1	51,2	90,7
<i>G. max</i> NSH2.2	43,3	78,1
<i>L. japonicus</i> NSH1	82,3	51,9
<i>L. japonicus</i> NSH2	53,3	87,9
<i>M. truncatula</i> NSH1	82,6	50,9
<i>M. truncatula</i> NSH2.1	48,3	80,7
<i>M. truncatula</i> NSH2.2	51,1	87,6
<i>N. tabacum</i> NSH1	74,3	50,6
<i>N. tabacum</i> NSH2	50,3	81,6
<i>O. sativa</i> NSH1.1	71,6	49,4
<i>O. sativa</i> NSH1.2	68,5	48,4
<i>O. sativa</i> NSH2	53,4	72,3
<i>P. trichocarpa</i> NSH1	77,2	51,1
<i>P. trichocarpa</i> NSH2	52,2	83,2
<i>S. lycopersicum</i> NSH1	75,6	49,7
<i>S. lycopersicum</i> NSH2	51,2	82,2
<i>T. aestivum</i> NSH1.1	69,8	47,8
<i>T. aestivum</i> NSH1.2	68,3	52,2
<i>T. aestivum</i> NSH2	51,2	72,4
<i>V. unguiculata</i> NSH1	91,6	51,6
<i>V. unguiculata</i> NSH2	52,8	94,1
ZmNRH1a	49,7	70,6
ZmNRH1b	50,2	69,3
ZmNRH2a	71,1	50,9
ZmNRH2b	72,6	50,9
ZmNRH3	72,8	52,2

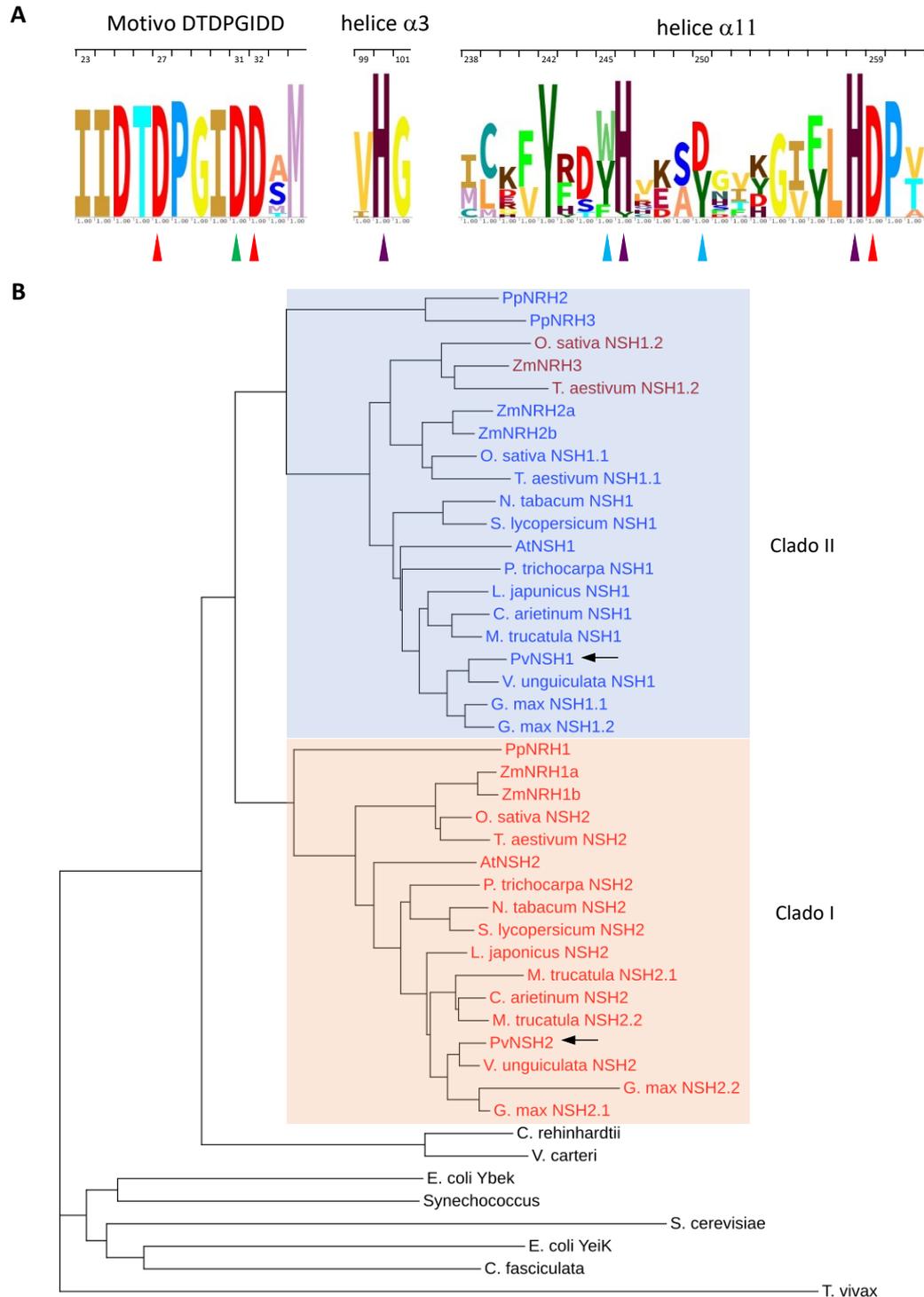


Figura 7. Conservación de la secuencia de aminoácidos de NSHs de plantas y cladograma. (A) Secuencia de logos del motivo DTDPGIDD y la hélice $\alpha 3$ y $\alpha 11$. Los triángulos rojos indican los residuos de Asp que se coordinan con el átomo de calcio. El Asp que se une al grupo 2-OH de la ribosa está marcado con un triángulo verde. Los triángulos azules indican residuos clave que participan en la unión de las nucleosidasas de plantas con el sustrato. Los triángulos morados señalan las histidinas conservadas. Los residuos se han numerado de acuerdo con la secuencia de PvNSH1. **(B)** Cladograma que muestra los dos clados de NSHs en plantas. El color del texto indica la subclase (azul: subclase II (Asp-250+Trp-245), rojo: subclase Ia (Tyr-250+Tyr-245), y negro: subclase Ib (Asp-250+Trp-245) como proponen Kopečna y col. (2013). Las nucleosidasas de *P. vulgaris* están señaladas con flechas.

1.2. Estudio de la región promotora de los genes *PvNSH1* y *PvNSH2*

Con el fin de identificar posibles motivos reguladores de la expresión de los genes *PvNSH1* y *PvNSH2* se llevó a cabo un análisis *in silico* de un fragmento de 1 kb de la región situada corriente arriba del inicio de la traducción (Materiales y Métodos 7). Dicho análisis reveló la presencia de múltiples motivos relacionados con la nodulación (CTCTT), con la respuesta de la planta a distintos estreses como deshidratación (CATGTG), frío (CANNTG) o defensa frente a patógenos (GAAAAA), y otros relacionados con proteínas de reserva (CATGCAY) y la regulación de hormonas como giberelinas (TGAC) o ácido abscísico (ACACNNG) (Figura 8).

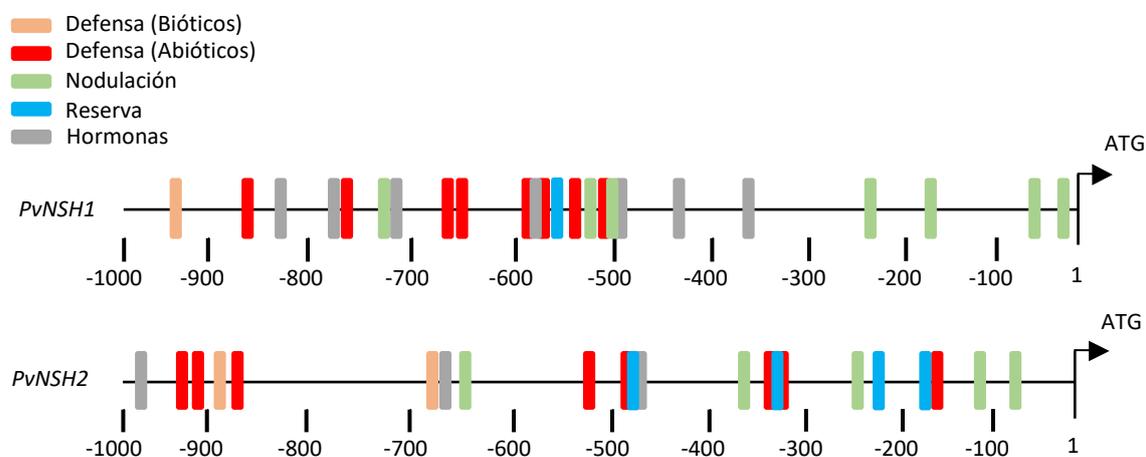


Figura 8. Representación esquemática de las regiones promotoras de *PvNSH1* y *PvNSH2*. Se analizó un fragmento de 1.000 bp situado corriente arriba del inicio de la traducción utilizando la base de datos *New Place* (Higo et al., 1999).

1.3. Sobreexpresión, purificación y caracterización de *PvNSH1* y *PvNSH2*

Para caracterizar las actividades enzimáticas de *PvNSH1* y *PvNSH2* de judía se procedió a expresar dichas enzimas en forma de proteínas recombinantes para, posteriormente, purificarlas y caracterizarlas.

El ORF de *PvNSH1* se amplificó con oligonucleótidos específicos que añadían los sitios de restricción para las endonucleasas *SalI* y *NotI* (Materiales y Métodos 2), se clonó en pSparkI (Canvax, España) y posteriormente en el vector de expresión pET30b+, lo que permitió su sobreexpresión como proteína de fusión en *E. coli* y su posterior purificación por cromatografía de afinidad (Materiales y Métodos 19.6). En la figura 9 se observa una banda entre 40 y 55 kDa tanto en el gel teñido con azul de Coomassie como en la

inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti-His. Esta banda se corresponde con el tamaño predicho para PvNSH1-His que es de aproximadamente 45 kDa (Figura 9A y B).

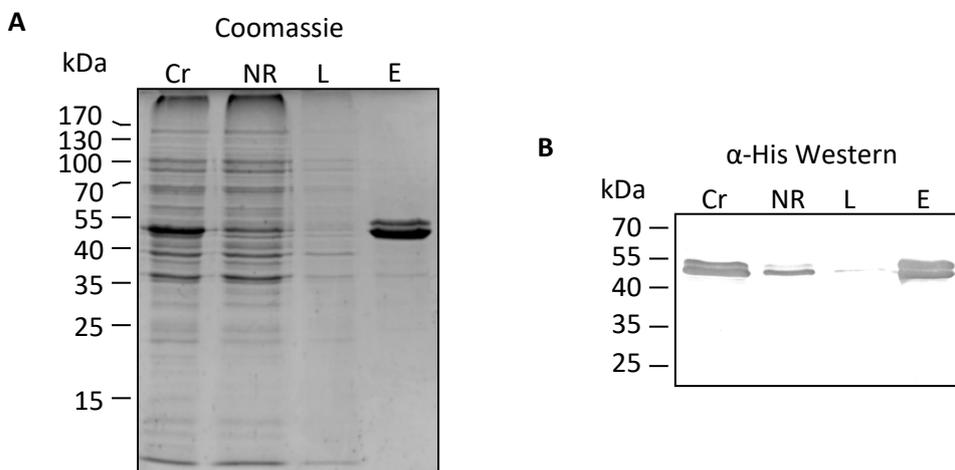


Figura 9. Purificación de la proteína recombinante PvNSH1 sobreexpresada en *E. coli*. (A) Tinción con azul de Coomassie. (B) Inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti-His. Cr: extracto crudo; NR: no retenido; L: lavado; E: elución.

Una vez purificada, se procedió a ensayar la actividad nucleosidasa in vitro (Materiales y Métodos 23). En un primer ensayo se observó que la proteína purificada presentaba actividad nucleosidasa, por lo que se procedió a caracterizar dicha actividad.

Para determinar la temperatura y pH óptimos se ensayó la actividad en un amplio rango de temperaturas (25 °C-70 °C) y distintos valores de pH (6-9). Como muestra la Figura 10A, la temperatura óptima fue de unos 45 °C, mientras que el pH óptimo en torno a 8 (Figura 10B).

Con respecto a la actividad con los diferentes nucleósidos, PvNSH1 mostró mayor afinidad por uridina, seguido de xantosina (53,4 % de la actividad con uridina). Con inosina la actividad fue menor (21,4 % de la actividad con uridina), con guanosina fue residual (3,2 %) y no se detectó actividad con timidina y citidina (Tabla 3). La actividad con adenosina no se ensayó debido a que no se pudo ajustar las condiciones de resolución óptimas para este sustrato.

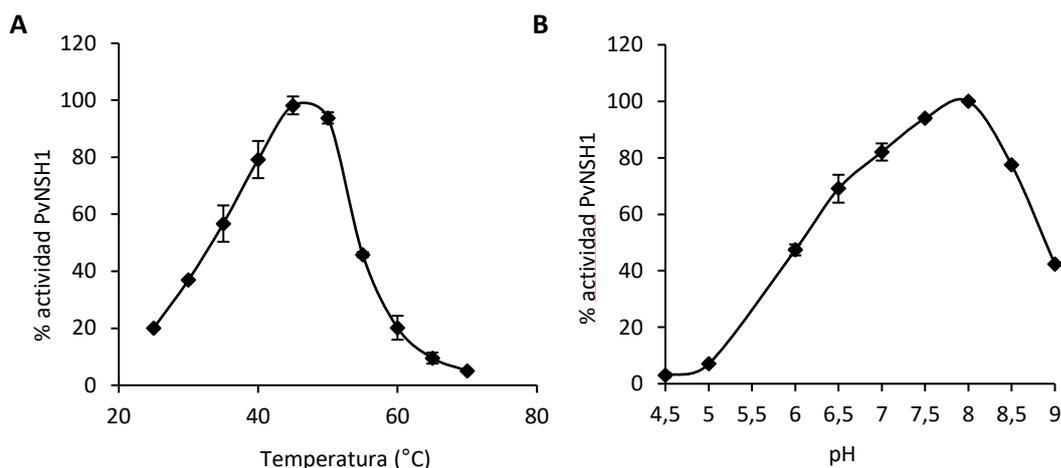


Figura 10. Determinación del efecto de la temperatura y pH sobre la actividad nucleosidasa de PvNSH1. (A) Para determinar la temperatura óptima se ensayó la actividad con xantosina como sustrato como se describe en Materiales y Métodos 23. Dicha mezcla se incubó a diferentes temperaturas (25 °C-70 ° C) durante 20 min y se utilizaron 3,8 µg de proteína. Se representa la actividad relativa con respecto al máximo, que fue de 2,050 U/mg. (B) Para la determinación del pH óptimo se ensayó la actividad utilizando xantosina como sustrato en una solución tamponada con Tris-HCl/TES/Succinato 50 mM ajustada a diferentes pHs (6-9), en las mismas condiciones que para la temperatura óptima. Se representa la actividad relativa con respecto al máximo, que fue de 1,671 U/mg.

Tabla 3. Especificidad de sustrato para PvNSH1.

Sustrato	Actividad relativa
	PvNSH1
Xantosina	53 ± 4,0
Inosina	21,4 ± 3
Guanosina	3,2 ± 0,0
Uridina	100 ± 9,7
Citidina	ND
Timidina	ND

La actividad enzimática se ensayó con una concentración de sustrato de 2 mM. El ensayo se realizó como se indica en Materiales y Métodos 23. La actividad de PvNSH1 con uridina (actividad específica 44,4 U mg⁻¹) se tomó como el 100 %.

Para la sobreexpresión de *PvNSH2* se siguió una estrategia similar a la utilizada para PvNSH1 (Materiales y Métodos 19.6). Como se observa en la figura 11, se produjo una proteína de 45 kDa que se corresponde con el tamaño aproximado para la proteína recombinante PvNSH2-His (44 kDa). Sin embargo, la mayor parte de la proteína precipitó con la fracción insoluble, lo que no permitió determinar actividad nucleosidasa con la escasa cantidad obtenida en la fracción soluble.

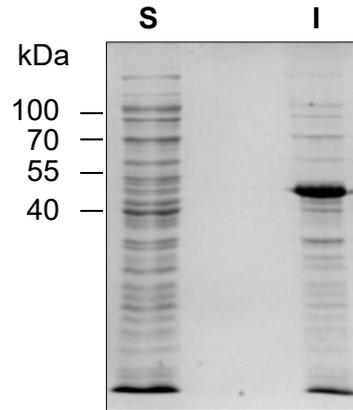


Figura 11. Sobreexpresión de la proteína recombinante PvNSH2-His en *E. coli*. La proteína recombinante se clonó en el vector pET30b+ y se sobreexpresó en *E. coli* BL21(DE3). Se muestra un SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. S: fracción Soluble; I: fracción insoluble.

Para intentar solventar este problema, se sobreexpresó *PvNSH2* de forma transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Para ello, el ORF de *PvNSH2* se amplificó con oligonucleótidos específicos (Materiales y Métodos 2) que añadieron los sitios de restricción *Hind*III y *Sma*I, el producto de PCR se clonó en el plásmido pXCS-HAStrepII (Materiales y Métodos 21.1), Con dicho plásmido se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK que se utilizaron para agroinfiltrar hojas de *N. benthamiana* y purificar la proteína recombinante por afinidad (Materiales y Métodos 21.2). Como muestra la Figura 12, se produjo una proteína de aproximadamente 37 kDa que se corresponde con el tamaño predicho para PvNSH2-HAStrep (37,4 kDa).

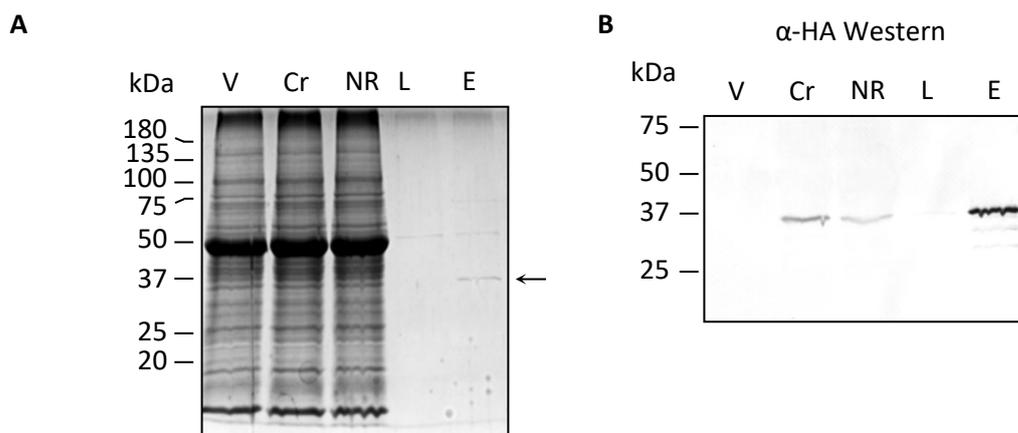


Figura 12. Purificación de la proteína recombinante PvNSH2-HAStrep sobreexpresada en *N. benthamiana*. La proteína recombinante se clonó en pXCS-HAStrep y se sobreexpresó en *N. benthamiana*. (A) Tinción con azul de Coomassie. (B) Inmunodetección con el anticuerpo monoclonal anti-HA. La flecha señala la proteína PvNSH2. Cr: extracto crudo; NR: no retenido; L: lavado; E: elución, V: vector vacío.

PvNSH2 así purificada mostró mayor actividad nucleosidasa con xantosina como sustrato, mientras que la actividad con uridina e inosina fue menor (13,1 y 18,9 % de la de xantosina, respectivamente) (Tabla 4). Al igual que ocurrió con PvNSH1, la actividad con guanosina fue muy baja y no se detectó actividad con citidina ni timidina.

Tabla 4. Especificidad de sustrato para PvNSH2

Sustrato	Actividad relativa
	PvNSH2
Xantosina	100 ± 11
Inosina	18,9 ± 0,3
Guanosina	4,5 ± 0,0
Uridina	13,1 ± 2,0
Citidina	ND
Timidina	ND

La actividad enzimática se ensayó con una concentración de sustrato de 2 mM. El ensayo se realizó como se indica en Materiales y Métodos 23. La actividad de PvNSH2 con xantosina (actividad específica 23,0 U mg⁻¹) se tomó como el 100 %.

Este resultado contrastó con lo previamente descrito para NSH2 de *Arabidopsis*, la cual careció de actividad, y sólo la presentó cuando interaccionó con AtNSH1 (Riegler et al., 2011; Baccolini y Witte, 2019). Estas diferencias nos hicieron plantear si PvNSH2 podría estar interaccionado con NSH1 nativa de *N. benthamiana* formando un heterómero que habría copurificado y que fuese el responsable de la actividad nucleosidasa detectada. Para explorar esta posibilidad, la fracción resultante de la purificación que contenía PvNSH2 se analizó por LC-MS/MS. Los resultados mostraron que el 72 % de la secuencia proteica coincidió con PvNSH2, con 29 péptidos únicos identificados (Tabla 5). Asimismo, no se identificaron péptidos de NSH1 de *N. benthamiana*, lo que sugiere que, o bien NSH1 de *N. benthamiana* no interaccionó con PvNSH2, o la cantidad de NSH1 de *N. benthamiana* que copurificó con PvNSH2 fue muy inferior a la cantidad de PvNSH2 purificada.

Tabla 5. Identificación de proteínas mediante LC-MS/MS de la fracción purificada de *PvNSH2* sobreexpresada como proteína recombinante en *N.benthamiana*.

Proteína		Número acceso	-10lgP	Cobertura de la muestra (%)	Péptidos	Únicos	Spec muestra	Masa media	Descripción
Grupo	ID								
1	76905	NSH2	374,93	72	31	31	124	34646	sp NSH2
1	56493	NbS00005145g0010.1	132,99	5	3	3	3	44569	nucleosidasa uridina 2
2	56332	NbS00046603g0005.1	314,04	15	27	5	31	245714	Acetil CoA carboxilasa
3	56333	NbS00016612g0003.1	289,17	18	22	3	26	162239	Acetil CoA carboxilasa
4	56337	NbS00008187g0001.1	241,47	30	6	3	9	28767	NADP uniendo Rossmann fold
5	56342	NbS00041576g0003.1	222,10	29	9	7	16	25764	Biotina carboxil proteína transportadora de acetil CoA carboxilasa
5	56353	NbS00008649g0004.1	209,62	24	8	6	14	25645	Biotina carboxil proteína transportadora de acetil CoA carboxilasa
6	56355	NbS00029393g0012.1	206,31	10	3	2	4	49090	Ribulosa bifosfato carboxilasa_oxygenasa activa 1 ch...
7	56354	NbS00007414g0017.1	204,33	29	7	5	16	26489	Acetil CoA carboxilasa biotina carboxil proteína transportadora
7	56369	NbS00021532g0013.1	197,47	24	6	4	14	27556	Biotina carboxil proteína transportadora de acetil CoA carboxilasa
8	56368	NbS00005925g0010.1	191,69	24	5	2	6	30026	Acetil CoA carboxilasa biotina carboxil proteína transportadora
9	56442	NbS00015644g0022.1	187,65	20	3	2	5	25889	Biotina carboxil proteína transportadora de acetil CoA carboxilasa
10	56347	NbS00001169g0153.1	167,23	17	5	4	5	36300	NbS00001169g0153.1
10	56348	NbS00019521g0023.1	163,11	18	5	4	5	34920	Gliceraldeido 3 fosfato deshidrogenasa A cloroplástica ...
11	56394	NbS00050671g0012.1	166,98	21	4	2	6	28666	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica 37
11	56395	NbS00019403g0016.1	166,98	21	4	2	6	28680	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica 4
11	56393	NbS00000471g0009.1	166,98	19	4	2	6	32576	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica 37
11	56397	NbS00032129g0003.1	166,98	21	4	2	6	28604	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica 4
12	56358	NbS00027305g0008.1	164,87	21	4	4	4	31046	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica 6G

12	56357	NbS00017935g0003.1	164,87	21	4	4	4	31085	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica 6A
13	56350	NbS00040865g0006.1	160,02	9	4	3	4	66646	Proteína de choque térmico
13	56360	NbS00000671g0042.1	153,28	9	4	3	4	63303	Proteína de choque térmico
13	56378	NbS00031872g0001.1	128,55	8	3	2	3	61999	Proteína de choque térmico
13	56411	NbS00039676g0017.1	116,49	7	3	2	3	62554	Proteína de choque térmico
14	56349	NbS00052944g0006.1	135,80	7	4	4	5	77399	Proteína cloroplástica relacionada con el choque térmico estromal de 70 KDa
14	56351	NbS00029684g0026.1	135,80	7	4	4	5	75244	Proteína de choque térmico cloroplástica 70 1
15	56372	NbS00006821g0002.1	131	8	4	4	5	53285	Fosfoglicerato quinasa
15	56373	NbS00001859g0006.1	131	7	4	4	5	58611	Fosfoglicerato quinasa
16	56427	NbS00035687g0007.1	124,79	11	2	2	2	29004	Fotosistema del cloroplasto II componente de 22 KDa
17	56387	NbS00006464g0001.1	124	9	3	3	3	41714	Cadena beta de tubulina
17	56450	NbS00023211g0007.1	93,04	7	2	2	2	37988	Cadena beta de tubulina
18	56414	NbS00004085g0015.1	119,11	19	3	3	3	23553	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica CP26
18	56478	NbS00008488g0031.1	98,31	17	2	2	2	15109	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica CP26
19	56392	NbS00003611g0307.1	115,55	5	2	2	2	42302	NbS00003611g0307.1
19	56396	NbS00041085g0002.1	115,55	5	2	2	2	48465	Actina
19	56417	NbS00017698g0005.1	115,55	5	2	2	2	46115	Actina 4
19	56494	NbS00009004g0014.1	99,81	5	2	2	2	49174	Actina
19	56495	NbS00018787g0010.1	99,81	4	2	2	2	49775	Actina 4
19	56505	NbS00056638g0007.1	99,81	7	2	2	2	31319	Actina 4
20	56433	NbS00010129g0001.1	114,79	7	2	2	2	35249	Beta 1 3 glucanasa
20	56434	NbC25742659g0003.1	114,79	6	2	2	2	37651	Glucano endo 1 3 beta glucosidasa_2C isoforma ácida GI9
21	56418	NbS00030208g0012.1	105,32	17	2	2	2	25861	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica P4
21	56419	NbS00004739g0001.1	105,32	16	2	2	2	27689	Clorofila a b unida a la proteína cloroplástica P4
22	56533	NbS00014241g0002.1	95,37	11	2	2	2	21846	ATP sintasa subunidad cloroplástica alfa

23	56518	NbS00061093g0007.1	93,28	12	2	2	2	22505	Subunidad III del centro de reacción del fotosistema I
23	56519	NbS00000058g0018.1	93,28	11	2	2	2	24306	Subunidad III del centro de reacción del fotosistema I
23	56520	NbS00035792g0016.1	93,28	11	2	2	2	24658	Subunidad III del centro de reacción del fotosistema I
23	56521	NbS00009051g0007.1	93,28	10	2	2	2	27312	Subunidad III del centro de reacción del fotosistema I

La identificación de las proteínas se llevó a cabo usando el software informático Peaks X con los parámetros descritos en Materiales y Métodos 22.

Además, se comprobó si PvNSH1-His y PvNSH2-HAStrep podían interactuar. Para ello se mezclaron extractos crudos de *E. coli* que sobreexpresaban PvNSH1-His y de *N. benthamiana* que sobreexpresaba PvNSH2-HAStrep y se incubaron, para posteriormente comprobar si PvNSH1-His podía ser copurificada por cromatografía de afinidad frente a StrepII, el tag fusionado a PvNSH2. Como controles, se utilizaron extractos de PvNSH1-His o PvNSH2-HAStrep mezclados con extractos de *N. benthamiana* o *E. coli* no transformados, respectivamente. Una vez realizada la cromatografía de afinidad, se inmunodetectó la presencia de PvNSH1-His y PvNSH2-HAStrep utilizando anticuerpos anti-His y anti-HA, respectivamente. Como se observa en la Figura 13, antes de la purificación, cada proteína pudo ser inmunodetectada con su anticuerpo correspondiente, de modo que, solo se detectaron ambas proteínas en la mezcla que contenía PvNSH1-His y PvNSH2-HAStrep. Sin embargo, cuando se realizó la cromatografía de afinidad frente a StrepII, se detectó PvNSH2-HAStrep pero no PvNSH1-His, lo que sugiere que, en nuestras condiciones de ensayo, PvNSH2 no interactúa con PvNSH1.

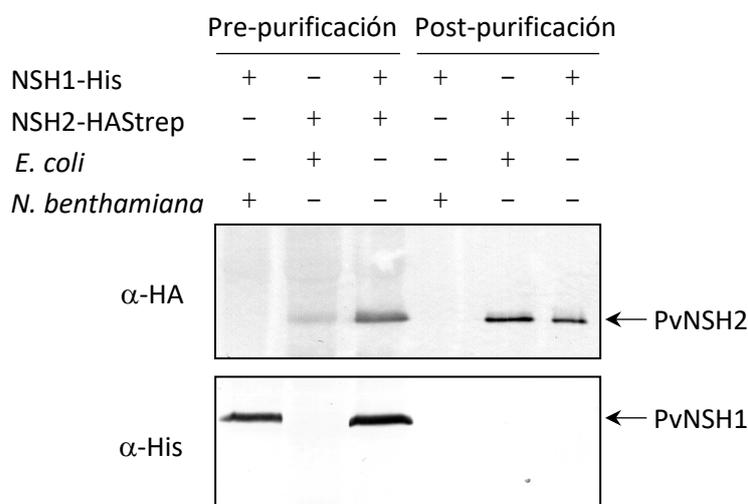


Figura 13. Estudio de la interacción de PvNSH1 y PvNSH2. Extractos de *E. coli* BL21 (DE3) y *N. benthamiana* que sobreexpresan PvNSH1-His y PvNSH2-HAStrep, respectivamente, se mezclaron entre ellos, así como con extractos de *N. benthamiana* y *E. coli* no transformados. Tras incubación durante 12 h a 4 °C, y purificación por cromatografía de afinidad frente a StrepII, se analizó la presencia de PvNSH2 y PvNSH1 mediante inmunodetección, utilizando anticuerpos anti-HA (α-HA) y anti-His (α-His) tanto antes como después de la purificación.

En resumen, la detección de actividad nucleosidasa en la fracción que contiene a PvNSH2, la no identificación de NSH1 en dicha fracción, y la no detección de PvNSH1 tras el ensayo de copurificación, sugiere fuertemente que PvNSH2 no necesita

interaccionar con PvNSH1 para ser activa, aunque no podemos descartar completamente que PvNSH2 también pueda formar heterómeros con PvNSH1.

1.4. Caracterización cinética de las nucleosidasas PvNSH1 y PvNSH2 de judía

Una vez purificadas ambas enzimas, se procedió a su caracterización cinética. Para ello se ensayó la actividad durante 20 min y utilizando concentraciones crecientes del sustrato (0,2-1 mM) (Materiales y Métodos 23). El comportamiento cinético de PvNSH1 y PvNSH2 se ajustó a una curva michaeliana (Figura 14). Para PvNSH1 los valores de K_m aparente para xantosina, uridina e inosina fueron 0,64, 2,02 y 0,99 mM, con una constante catalítica superior para uridina e inferior para inosina, pero con una eficiencia catalítica relativamente similar para todos los sustratos (Tabla 6, Figura 15).

Tabla 6. Parámetros cinéticos de PvNSH1 y PvNSH2.

Sustrato	PvNSH1			PvNSH2		
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
Xantosina	$0,64 \pm 0,11$	$20,41 \pm 1,42$	$32,04 \pm 3,49$	$0,12 \pm 0,02$	$13,18 \pm 0,26$	$116,01 \pm 15,19$
Inosina	$0,99 \pm 0,04$	$10,35 \pm 0,40$	$10,48 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,02$	$2,91 \pm 0,14$	$13,67 \pm 0,64$
Uridina	$2,02 \pm 0,27$	$62,88 \pm 7,6$	$31,21 \pm 0,44$	-	-	-

La K_m aparente de PvNSH2 para xantosina e inosina fue 0,12 y 0,21 mM, respectivamente, que es unas cinco veces menor que la de PvNSH1 para estos sustratos (Tabla 6, Figura 14). En cuanto a la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) de PvNSH2, esta fue más de tres veces superior a la de PvNSH1.

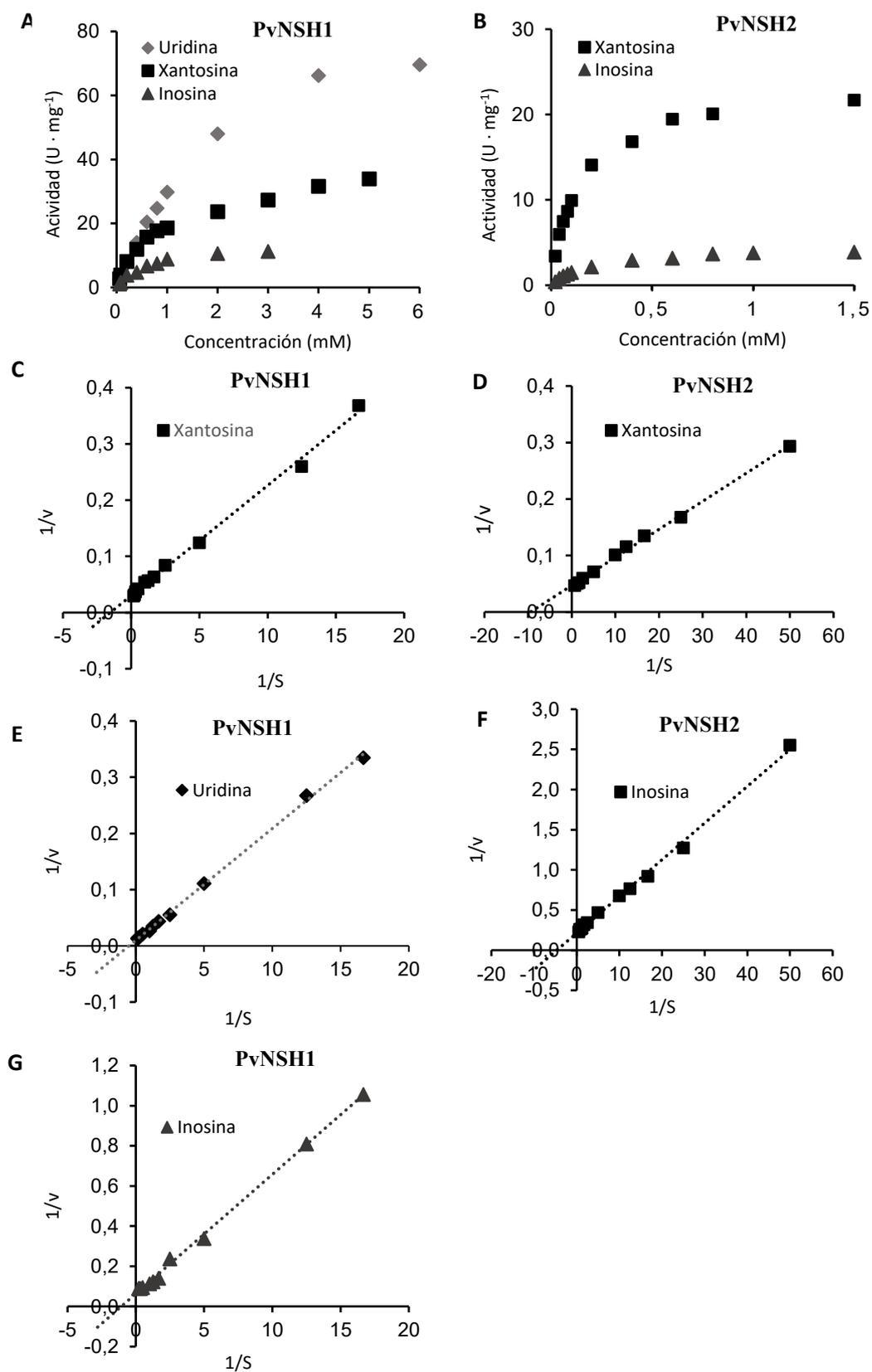


Figura 14. Curva de Michaelis-Menten de la actividad de PvNSH1 con xantosina, uridina e inosina (A) y de PvNSH2 con xantosina e inosina. (B) Representación de Lineweaver-Burk para PvNSH1 (C, E, G) y PvNSH2 (D, F).

**CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS PVNSH3 Y
PVNSH4 DE JUDÍA**

2.1. Clonación y caracterización de las secuencias de las nucleosidasas *PvNSH3* y *PvNSH4* de judía

Además de las nucleosidasas citosólicas, en *Arabidopsis thaliana* se ha descrito una nucleosidasa con posible localización apoplástica, AtNSH3 (Jung et al., 2011), y que se caracteriza por presentar dos dominios nucleosidasa. Para identificar y clonar los ADNc que codifican posibles nucleosidasas apoplásticas de judía se realizó un análisis mediante *tBLASTn* en la base de datos *Phytozome* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) utilizando la secuencia de AtNSH3 de *Arabidopsis thaliana* como modelo. El análisis permitió identificar dos secuencias que codifican posibles nucleosidasas apoplásticas en judía (Phvul.006g159400 y Phvul.003g099100). A partir de estas secuencias se diseñaron cebadores específicos (Materiales y Métodos 2) que se utilizaron para la amplificación mediante RT-PCR de los ADNc de ambos genes, y que, tras su clonación y secuenciación, se denominaron *PvNSH3* y *PvNSH4*. Para *PvNSH3*, la secuencia nucleotídica correspondientes al mayor marco abierto de lectura (ORF) fue de 2.634 pb lo que codifica un polipéptido de 877 aminoácidos con una masa molecular predicha de 98,4 kDa, mientras que para *PvNSH4*, el mayor ORF fue de 2.628 pb, lo que codifica un polipéptido de 875 aminoácidos con una masa molecular predicha de 96,4 kDa. *PvNSH3* y *PvNSH4* presentan una similitud con AtNSH3 del 67 y 64%, respectivamente, y del 78% entre ellas. Además, ambas se caracterizan por poseer repetido el dominio rico en aspartato característico de todas las nucleosidasas, si bien, al igual que ocurre en AtNSH3, en el segundo dominio uno de los Asp está sustituido por Gly.

El análisis *in silico* de las secuencias de *PvNSH3* y *PvNSH4* predijo que ambas proteínas presentan un péptido señal de 18 y 22 aminoácidos, respectivamente, y que se trata de proteínas solubles localizadas con mayor probabilidad en el espacio apoplástico (con valores de predicción de 0,728 y 0,602 para *PvNSH3* y *PvNSH4*, respectivamente) (Tabla 7).

Las secuencias de *PvNSH3* y *PvNSH4* se utilizaron para identificar secuencias similares en otras especies mediante la herramienta web *HMMER* (<http://hmmer.org/>). Tras un primer análisis, se seleccionaron aquellas secuencias con más del 45 % de similitud con *PvNSH3* y/o *PvNSH4* y de un tamaño superior a 800 aminoácidos para descartar a las nucleosidasas citosólicas o las secuencias parciales. Todas las secuencias identificadas fueron de plantas, y la mayoría pertenecieron a los grupos de monocotiledóneas y

dicotiledóneas dentro de las angiospermas, excepto dos, *Selaginella moellendorffii* que pertenece a las licofitas, y *Amborella trichopoda*, que es la angiosperma más primitiva.

Tabla 7. Predicción de la localización de PvNSH3 y PvNSH4.

Péptido señal			
Proteína	Presencia	Nº Aminoácidos	Localización (Valor predicción)
PvNSH3	Sí	18	Extracelular (0,728)
PvNSH4	Sí	22	Extracelular (0,602)

La predicción del péptido señal se realizó con TargetP-2.0 (Armenteros et al., 2019) y la localización subcelular con DeepLoc-1.0 (Armenteros et al., 2017).

También se realizó una búsqueda en la bases de datos NCBI y Phytozome lo que confirmó que no existían secuencias similares a estas en los distintos grupos de gimnospermas, ni en monilofitas (helechos), licofitas, hepáticas, briofitas, ni tampoco en especies pertenecientes a otros reinos como *Cernorhabditis elegans* (Animalia), *Schizosaccharomyces pombe* (Fungi), *Crithidia fasciculata*, *Leishmania major* y *Trypanosoma vivax* (Protista), lo que confirmó que no existen ortólogos de *PvNSH3* y *4* en estas especies.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *PvNSH3* y *PvNSH4* con el resto de las secuencias identificadas reveló una identidad de entre el 60 y el 90 % (Tabla 8). Los dos dominios ricos en Asp presentes en *AtNSH3* (DXDXXXDD y DXDXXXGD), se conservan en todas las secuencias identificadas, excepto en *Selaginella moellendorffii*, que presenta una sustitución de una Asp por una Glu en el primer dominio (DXDXXXED) (Figura 15) y *Physcomitrella patens* que no presenta el segundo dominio presente en todas las demás especies.

El análisis filogenético (Figura 16) de las posibles nucleosidasas apoplásticas mostró que, en el caso de las dicotiledóneas, las especies pertenecientes a la familia *Fabaceae* se agrupan en un clado que diverge en otros dos, en cada uno de los cuales se encuentra una de las posibles nucleosidasas apoplásticas de judía, *PvNSH3* y *PvNSH4*. La secuencia aminoacídica utilizada como grupo externo fue la de *Physcomitrella patens*, una secuencia con un único dominio nucleosidasa, y como era de esperar, se encuentra en una rama externa. Por otro lado, la pteridofita *Selaginella moellendorffii*, es la especie más alejada filogenéticamente en la que se encontró una secuencia que podría codificar nucleosidasas apoplásticas y se localiza en un clado diferente al resto de secuencias.

Tabla 8. Porcentajes de similitud de PvNSH3 y PvNSH4 con otras NSHs de plantas.

	PvNSH4	PvNSH3
PvNSH4	-	-
PvNSH3	78,7	-
<i>Amborella trichipoda</i>	67,9	66,5
AtNSH3	64,4	67,2
AtNSH4	70,3	67,1
<i>Cicer arietinum4</i>	81,8	77,9
<i>Cicer arietinum3</i>	79,7	81,9
<i>Glycine maiz3</i>	77,3	83,7
<i>Glycine maiz4</i>	89,2	80,5
<i>Glycine maiz5</i>	77,9	88,4
<i>Medicago trunculata3</i>	78,4	80,8
<i>Medicago trunculata4</i>	83,3	78,6
<i>Medicago trunculata5</i>	80,8	77,3
<i>Nicotiana tabacum4.1</i>	71,7	69,1
<i>Nicotiana tabacum4.2</i>	70,3	68,8
<i>Populus trichocarpa4</i>	74,8	72,7
<i>Quercus suber4.1</i>	74,8	73
<i>Quercus suber4.2</i>	71	69,2
<i>Oryza sativa4.1</i>	58,5	57,6
<i>Oryza sativa4.2</i>	65,9	65,1
<i>Solanum lycopersicum4.1</i>	69,2	67,6
<i>Solanum lycopersicum4.2</i>	71,5	69,7
<i>Solanum lycopersicum4.3</i>	70,3	68,6
<i>Theobroma cacao3</i>	61,8	61,8
<i>Theobroma cacao4</i>	75,8	74,4
<i>Triticum aestivum4</i>	64,8	64,5
<i>Vitis vinifera4.1</i>	60,8	58,9
<i>Vitis vinifera4.2</i>	74,5	72,7
<i>Selaginella</i>	47	46,6
<i>Physcomitrella patens</i>	33,5	34,3

		DXDXXXDD		DXDXXXGD
		30		500
PvNSH3	-----QHRRILL	DTDVDTDDVF	'ALLYLLKLNK	DMDMSVGDFLA
PvNSH4	-----RPHRILV	DTDVDTDDL	'ALLYLIKLNT	DMDMSAGDFLA
Amborella trichopoda.	-----KPRQILL	DTDVDTDDFF	'AIFYLLKQNR	DMDMSAGDIVA
AtNSH3	-----SSHRIIV	DTDVDTDDL	'AILYLLKLNK	DMDMSAGDFLS
AtNSH4				DMDMSAGDFLS
AtNSH5	-----SPHRILL	DTDVDTDDFI	ALLYLLKLNK	
Cicer arietinum3	-----KPQRILL	DTDVDTDDFF	ALLYLLKLNK	DMDMSAGDFLA
Cicer arietinum4	-----NPRRIVV	DTDVDTDDL	ALLYLLKLNQ	DMDMSAGDFLA
Glycine max3	-----KPRRILL	DTDVLDLDDVF	ALLYLLKLNK	DMDMSVGDFLA
Glycine max4	-----KPRRILL	DTDVLDLDDVF	ALIYLLKHNR	DMDMSVGDFLA
Glycine max3.2.	-----APHRILV	DTDVDTDDFF	ALLYLLKLNK	DMDMSAGDFLA
Medicago trunculata4.2.	-----KQRILL	DTDVDTDDL	ALLYLLKLNK	DMDMSAGDFLA
Medicago trunculata4	-----KPHRIVV	DTDVATDDL	ALLYLLKLNK	DMDMSAGDFLA
Medicago truncatula3	-----KQRIVV	DTDVDTDDL	ALLYLLKLNK	DMDMSAGDFLA
Nicotiana tabacum4.1	-----RRPHRILV	DTDMTDDL	ALFYLLKLNK	DMDMSAGDFLA
Nicotiana tabacum4.2	-----HHPRRILV	DTDMTDDFF	ALLYLLKLNK	DMDMSAGDFLA
Populus trichocarpa4	-----KPHRILL	DTDVDTDDFF	ALLYLLKLNK	DMDMSAGDFLA
Quercus suber4.1	-----LPHRILL	DTDVDTDDFF	ALLYLLKQNR	DMDMSAGDFLA
Quercus suber4.2	-----LPHRILL	DTDVDTDDFF	ALLYLLKQNR	DVMSAGDFLA
Oryza sativa4.1	-----AKPRRILV	DTDMTDDL	ALLYLLKQNR	DVMSAGDFLA
Oryza sativa4.2 .pro	-----AKPRRILV	DTDMTDDL	ALLYLLKQNR	DMDMSPGDFVS
Solanum lycopersicum4.2	-----LHRILL	DTDVDTDDFF	ALFYLLKLNK	DMDMSPGDFIS
Solanum lycopersicum4.3	-----HRILV	DTDMTDDFF	ALFYLLKLNK	DMDMSAGDFIA
Solanum lycopersicum4.1	-----HRVLL	DTDMGTDDIF	ALLYLLKLSK	DMDMSAGDFLA
Theobroma cacao3	-----KPHRILL	DTDVDTDDFF	ALLYLLKLNK	DMDMSAGDFLS
Theobroma cacao4	-----QPHRILV	DTDVDTDDVF	ALFYLLKQDR	DMDMSAGDFMA
Triticum aestivum4	-----AAPQRILL	DTDMTDDL	ALMYLLKQNR	DMDMSAGDFLA
Vitis vinifera4.1	-----RPHRILL	DTDVDTDDFF	AILYLLKLNK	DMDMSAGDFVS
Vitis vinifera4.2	QLQIRARPRRILM	DTDVDMDDFF	SLFYLLKENT	DMDMSAGDFLA
Selaginella moellendorffii	KDAAAAPKLNVL	DTDLVDV	AIFYLLKQNR	DMDMSTGDLIA
Physcomitrella patens	-----RKRVII	DTDPGIDMM	AIFMAFEAP-	DMDMSPGDILT

Figura 15. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de posibles nucleosidasas apoplásticas pertenecientes a diferentes especies vegetales. El alineamiento se centra en los dominios DXDXXXDD y DXDXXXGD (Asp y Gly están sombreados en azul). *S. moellendorffii* presenta una sustitución de un Asp por un Glu en el primer dominio (sombreado en amarillo). Los números de acceso de las secuencias se indican en Materiales y Métodos 7. Los aminoácidos se numeran según la secuencia de *PvNSH4*.

Mientras que en la mayoría de plantas se han identificado, al menos, dos secuencias que codifican posibles nucleosidasas apoplásticas, en *Arabidopsis thaliana* solo se ha identificado una (*AtNSH3* codificada por el gen At5g18860; Jung et al., 2011). Sin embargo, se han identificado otros dos genes con alta similitud a *AtNSH3*: *AtNSH4* (At5g18890), que codifica un polipéptido de 551 aminoácidos que presenta alta similitud (81 %) con el extremo C-terminal de *AtNSH3*, y *AtNSH5* (At5g18870), que codifica un péptido de 259 aminoácidos con alta similitud (73 %) con la mitad N-terminal de *AtNSH3* y que fueron descritas como posibles nucleosidasas truncadas (Jung et al., 2011). Ambos genes están en la misma orientación y seguidos en el genoma de *Arabidopsis*, lo que nos llevó a analizar con más detenimiento dichas secuencias y el fragmento que las separaba. Esto permitió reconstruir una secuencia que codifica un péptido de 865 aminoácidos y que podría codificar una segunda nucleosidasa apoplástica de *Arabidopsis* (Figura 17).

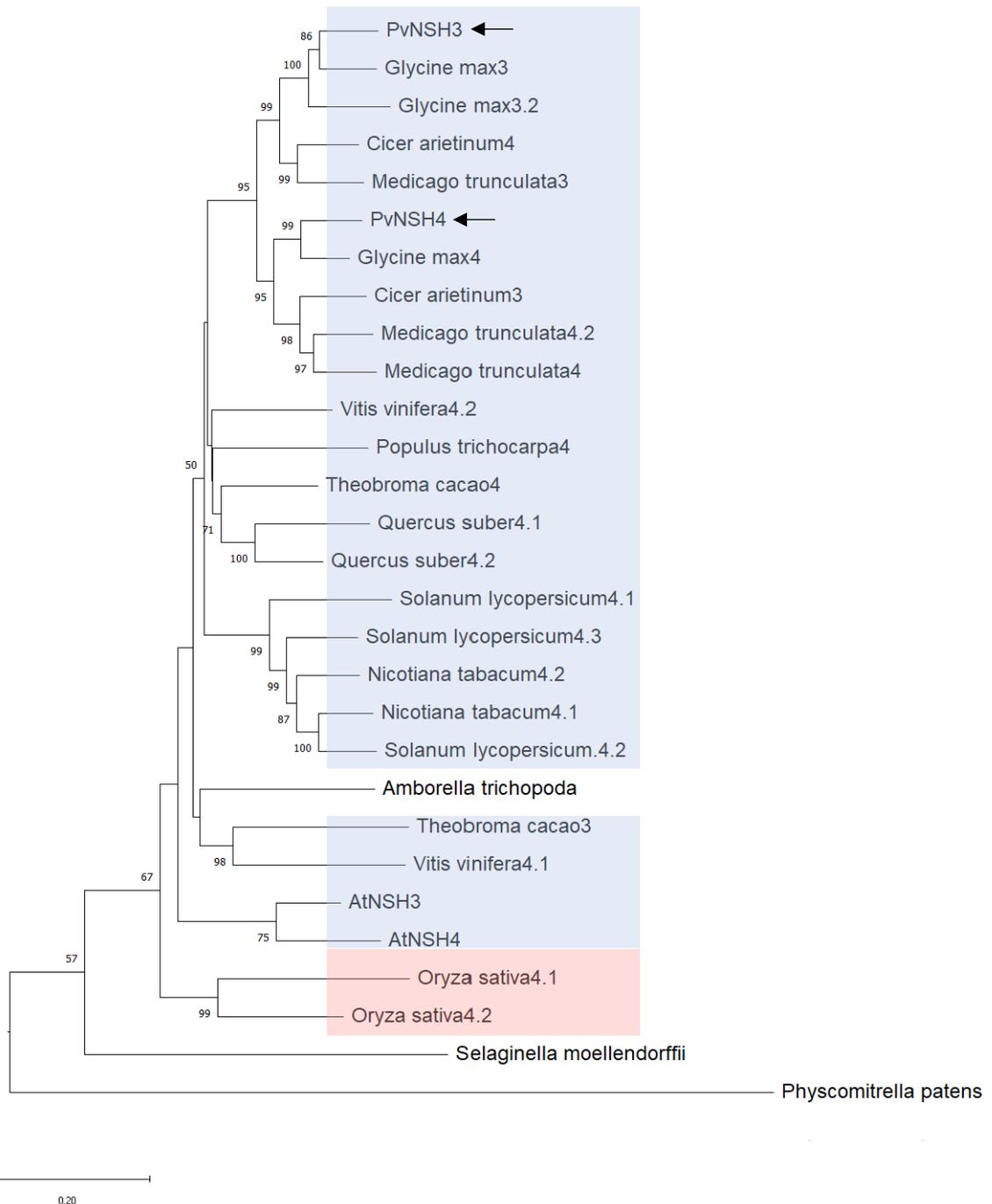


Figura 16. Cladograma de las secuencias similares a PvNSH3 y PvNSH4 identificadas. Las secuencias de las posibles nucleosidasas apoplásticas identificadas en algunas especies de dicotiledóneas están marcadas en azul y en rosa las pertenecientes a monocotiledóneas. Las posiciones de PvNSH3 y PvNSH4 están señaladas con una flecha. El árbol filogenético se construyó con el programa MEGA X, utilizando el modelo neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y la distancia evolutiva se calculó utilizando el método de corrección de Poisson (Zuckerandl y Pauling, 1965). Los números en los nodos representan los valores de “bootstrap” con 1.000 réplicas y la barra de escala corresponde a 20 cambios por cada 100 posiciones. Para mayor claridad, solo se representan los valores de los nodos superiores a 50. Se utilizó como “outgroup” la secuencia de la nucleosidasa de *Physcomitrella patens*. Los números de acceso correspondientes a las secuencias aminoacídicas se encuentran en Materiales y Métodos 7.

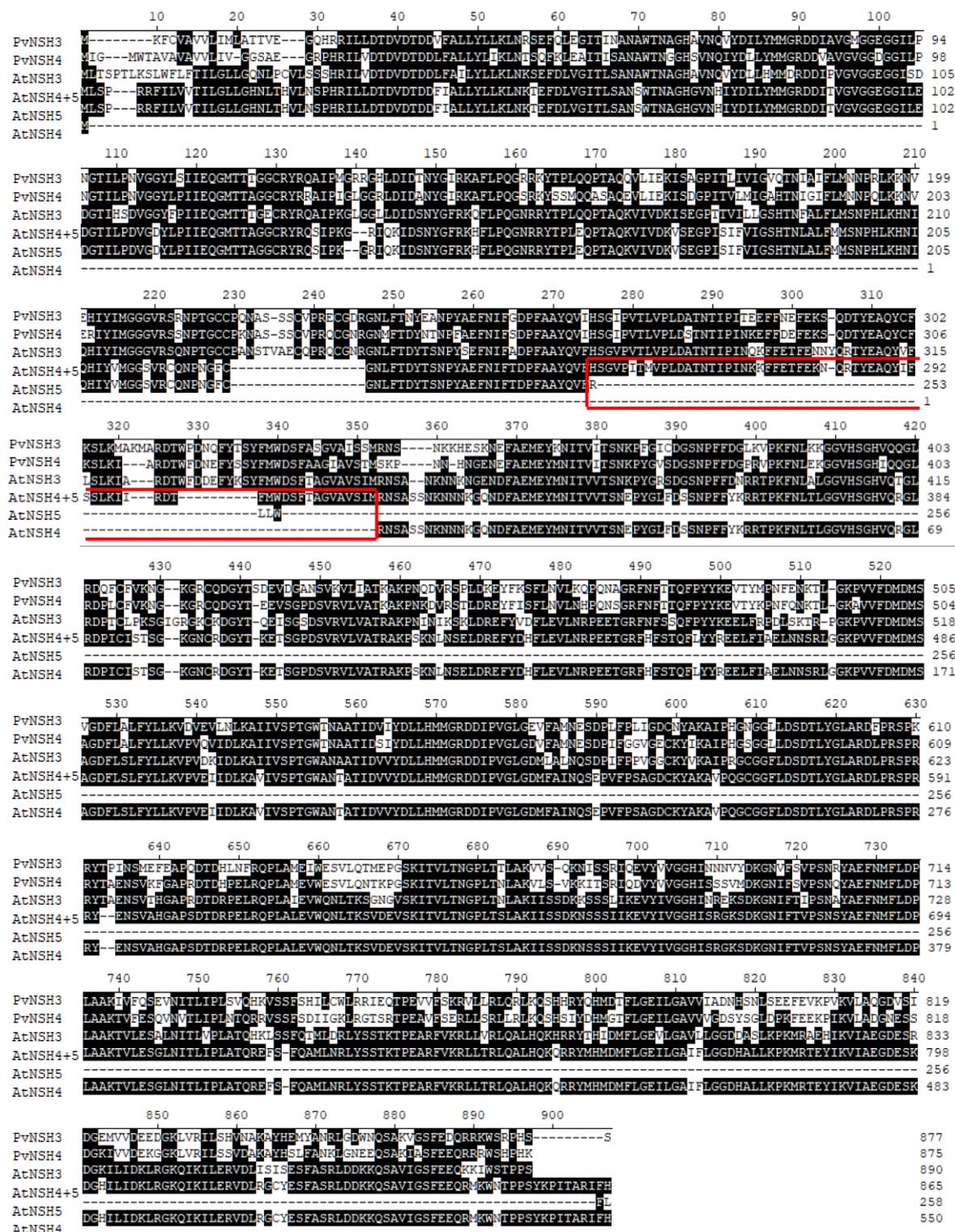


Figura 17. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína AtNSH4+5 reconstruida con AtNSH3, AtNSH4 y AtNSH5 de *Arabidopsis*, y PvNSH3 y PvNSH4 de *P. vulgaris*. El alineamiento se realizó utilizando el método Clustal V del paquete informático DNASTAR. El recuadro rojo marca el fragmento de secuencia identificado en este trabajo.

Para intentar determinar si dicho ADNc realmente se transcribe en *Arabidopsis*, se diseñaron oligonucleótidos específicos a ambos extremos de dicha secuencia y se realizó

RT-PCR sobre cDNA de plántulas de *Arabidopsis*, pero no se obtuvo amplificación.

2.2. Análisis de la región promotora de *PvNSH3* y *PvNSH4*

Con el fin de identificar posibles motivos reguladores de la expresión de los genes *PvNSH3* y *PvNSH4* se realizó un análisis *in silico* de un fragmento de 1 kb de la región situada corriente arriba del inicio de la transcripción (Materiales y Métodos 7). Dicho análisis reveló la presencia de múltiples motivos relacionados con la respuesta a distintos tipos de estrés, como la respuesta a deshidratación (WAACCA), frío (CANNTG), defensa frente a patógenos (TACTATT) o herida (TGACY) (Figura 18).

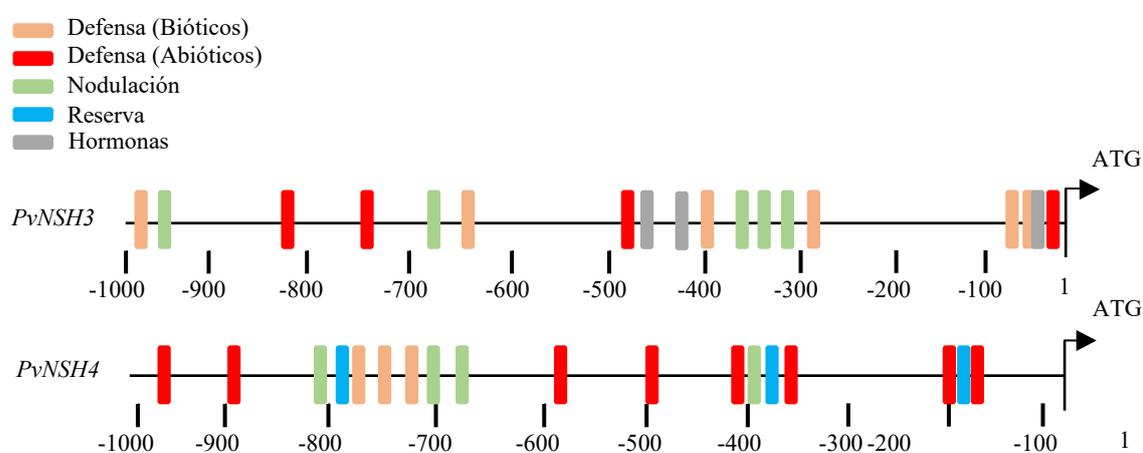


Figura 18. Representación esquemática de las regiones promotoras de *PvNSH3* y *PvNSH4*. Se analizó un fragmento de 1.000 pb situado corriente arriba del inicio de la traducción utilizando la base de datos New Place (Higo et al., 1999).

2.3. Sobreexpresión, purificación y caracterización de *PvNSH3* y *PvNSH4*

Para caracterizar las actividades enzimáticas de *PvNSH3* y *PvNSH4* se procedió a expresar dichas enzimas en forma de proteínas recombinantes, para, posteriormente, purificarla y caracterizarla.

El ORF de *PvNSH4* se amplificó con oligonucleótidos específicos que añadían los sitios de restricción *Cla*I y *Sma*I, (Materiales y Métodos 2), se clonó en pSparkI (Canvax, España) y posteriormente en el vector de expresión pXCS-HAStrepII, lo que permitió su sobreexpresión como proteína de fusión en *N. benthamiana* y su posterior purificación por cromatografía de afinidad (Materiales y Métodos 21.2). Como se observa en la Figura

19, el análisis por inmunodetección reveló una señal de más de 100 kDa tras la purificación, lo que podría corresponderse con PvNSH4-HAStrep.

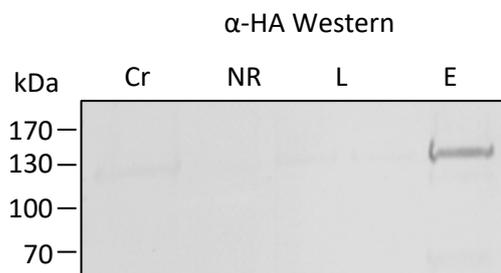


Figura 19. Purificación de la proteína recombinante PvNSH4-HAStrep sobreexpresada en *N. benthamiana*. Se muestra el resultado de la inmunodetección utilizando anticuerpos anti-HA. Cr: extracto crudo; NR: no retenido; L: lavado; E: elución.

Una vez purificada la enzima, se procedió a su caracterización físico-química y cinética. En primer lugar, se determinó el pH óptimo del ensayo. Para ello se ensayó la actividad a distintos valores de pH (entre 4,2 y 6,8), utilizando inosina como sustrato (Materiales y Métodos 23). Como muestra la figura 20, PvNSH4 presentó mayor actividad a valores de pH cercanos a 5, lo que tendría sentido en una enzima con localización apoplástica, ya que el pH en este espacio suele ser ácido (Gjetting et al., 2012). La actividad de esta enzima fue disminuyendo hasta ser prácticamente inexistente a pH 6,8.

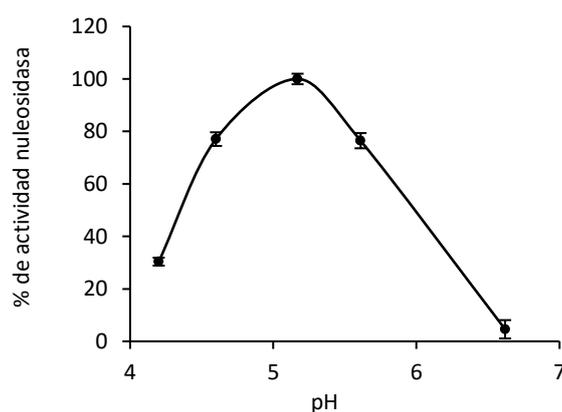


Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad nucleosidasa de PvNSH4. La actividad se ensayó como se describe en Materiales y Métodos 23, utilizando inosina 2 mM como sustrato en una solución tamponada con Tris-HCl/TES/Succinato 50 mM ajustada a diferentes pHs (4,2-6,8). La mezcla de reacción se mezcló con la enzima purificada y se incubó a 40 °C durante 120 min. Se representa la actividad relativa con respecto al máximo, que fue de 21,61 mU/ml.

A continuación, se analizó la actividad de PvNSH4 con diferentes nucleósidos, lo que mostró que PvNSH4 tiene mayor afinidad por inosina, seguido de xantosina (19 % de la de inosina) y adenosina (4 % frente al de inosina), mientras que con uridina fue indetectable. (Tabla 9).

Tabla 9. Especificidad de sustrato para PvNSH4.

Sustrato	Actividad relativa
	PvNSH4
Inosina	100 ± 4,0
Xantosina	19 ± 1,7
Adenosina	4 ± 0,0
Uridina	ND

La actividad enzimática se ensayó con una concentración de sustrato de 2 mM. El ensayo se realizó como se indica en Materiales y Métodos 23. La actividad de PvNSH4 con inosina (actividad específica 16,66 U/mg) se tomó como el 100 %.

Para la caracterización cinética de PvNSH4 se ensayó la actividad con concentraciones crecientes de inosina (0,01-0,5 mM), ya que fue el sustrato con el que presentó mayor actividad. (Materiales y Métodos 23). El comportamiento cinético de PvNSH4 se ajustó a una curva michaeliana (Figura 21), con un valor de K_m aparente de 54 μM y una eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) de 642.666 $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ (Tabla 10).

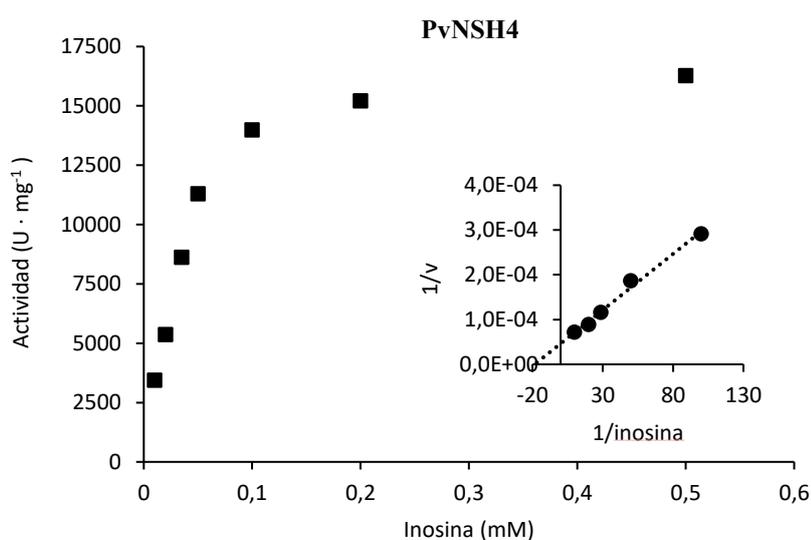


Figura 21. Curva de Michaelis-Menten de la actividad PvNSH4 con inosina. El inserto muestra la representación de Lineweaver-Burk para dicha actividad.

Tabla 10. Parámetros cinéticos dePvNSH4

PvNSH4			
Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)
Inosina	$54,00 \pm 2,34$	34.776 ± 1.085	642.666 ± 8.925

Para la sobreexpresión y purificación de PvNSH3 se siguió la misma estrategia que con PvNSH4. Sin embargo, tras varios intentos de sobreexpresión en *N. benthamiana* y purificación por cromatografía de afinidad, solo en uno de ellos se consiguió inmunodetectar una señal muy tenue de algo más de 100 kDa, que se aproxima al tamaño predicho para PvNSH3-HAStrep (101 kDa) (Figura 22). Dicha señal fue visible tanto en los extractos crudos como en el resultado de la elución tras la cromatografía de afinidad. La limitada cantidad de proteína obtenida solo permitió ensayar la actividad con dos sustratos, inosina y xantosina, y a un único valor de pH, por lo que se seleccionó pH 5, el valor óptimo de las nucleosidasas apoplásticas PvNSH4 y AtNSH3. Sin embargo, con ninguno de los sustratos ensayados se consiguió detectar actividad nucleosidasa.

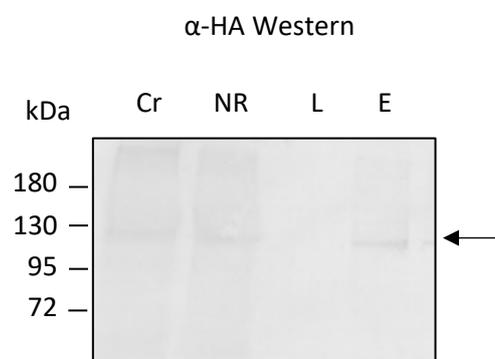


Figura 22. Purificación de la proteína recombinante PvNSH3-HAStrep sobreexpresada en *N. benthamiana*. Se muestra el resultado de la inmunodetección utilizando anticuerpos anti-HA. La flecha señala la proteína PvNSH3. Cr: extracto crudo; NR: no retenido; L: lavado; E: elución.

Con la intención doble de, por un lado, estudiar si un cambio en el organismo utilizado para la sobreexpresión de PvNSH3 podría dar lugar a la síntesis de la enzima funcional y, por otro lado, una concentración más elevada, de modo que permitiese su utilización para la producción de anticuerpos policlonales anti-PvNSH3 se decidió probar a sobreexpresarla en *E. coli* BL21 (DE3). Para ello, el ORF de *PvNSH3* se clonó en el vector pET30b+ para la posterior transformación de *E. coli* BL21(DE3) (Materiales y Métodos

19.3). Sin embargo, la mayor parte de la proteína precipitó en la fracción insoluble y no se logró su solubilización. Con la intención de mejorar su solubilidad, *PvNSH3* se clonó en pET-His6-SUMO-TEV LIC, un vector que permite la expresión de la proteína fusionada traduccionalmente a la proteína SUMO, lo que facilita su solubilidad (Materiales y Métodos 19.4). Además, los reducidos niveles de sobreexpresión de *PvNSH3* en *N. benthamiana* hicieron contemplar la posibilidad de que dicha proteína pudiese tener un efecto tóxico para las células. Para intentar prevenirlo, se utilizó la cepa BL21(DE3) pLysS de *E. coli*, que reduce la expresión basal de la proteína de interés, lo que mejora la expresión de proteínas que presentan toxicidad. La sobreexpresión de *PvNSH3* en este sistema permitió identificar una señal de algo más de 100 kDa en los extractos crudos, que se hizo más tenue una vez se purificó, a la vez que apareció una señal mayoritaria de aproximadamente 60 kDa que podría ser el resultado de la proteólisis de *PvNSH3* (Figura 23). De cualquier manera, ni los extractos crudos ni el resultado de la elución presentaron actividad nucleosidasa con los sustratos ensayados (xantosina e inosina), lo que sugiere que, o bien *PvNSH3* presenta actividad con algún nucleósido no ensayado o en condiciones de ensayo distintas de las empleadas, o la enzima carece de actividad. Además, la cantidad de proteína sintetizada con todos los sistemas utilizados no permitió obtener suficiente cantidad para sintetizar anticuerpos.

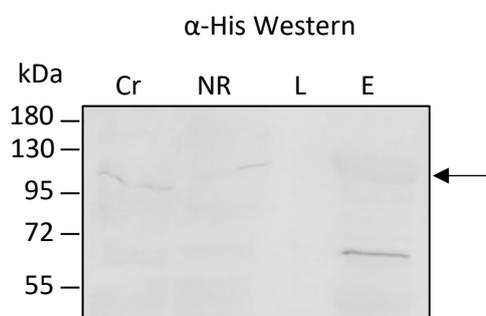


Figura 23. Purificación de la proteína recombinante PvNSH3-His-SUMO sobreexpresada en *E. coli* BL21(DE3) pLysS. La flecha señala la proteína PvNSH3. Inmunodetección con el anticuerpo anti-His. Cr: extracto crudo; NR: no retenido; L: lavado; E: elución.

2.4. Localización subcelular de PvNSH3 y 4 mediante microscopía confocal

El análisis *in silico* de las secuencias aminoacídicas de *PvNSH3* y 4 predijo que ambas enzimas presentan un péptido señal y que su localización más probable sería el apoplasto. Para comprobarlo, se realizaron fusiones traduccionales de *PvNSH3* y *PvNSH4* con eYFP

(*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), y se procedió a su expresión transitoria en *N. benthamiana* para su posterior detección mediante microscopía confocal.

La señal de fluorescencia de PvNSH4-eYFP se detectó en la interfase de células adyacentes y colocalizó con la del marcador apoplástico AT5G11420 (Figura 24 A-C). Sin embargo, cuando se expresó junto con la proteína citosólica (Figura 24 D-F) o de membrana plasmática (Figura 24 G-I) PvNSH4 ocupó espacios diferentes a los de dichas proteínas. Estos resultados confirman la localización apoplástica de PvNSH4.

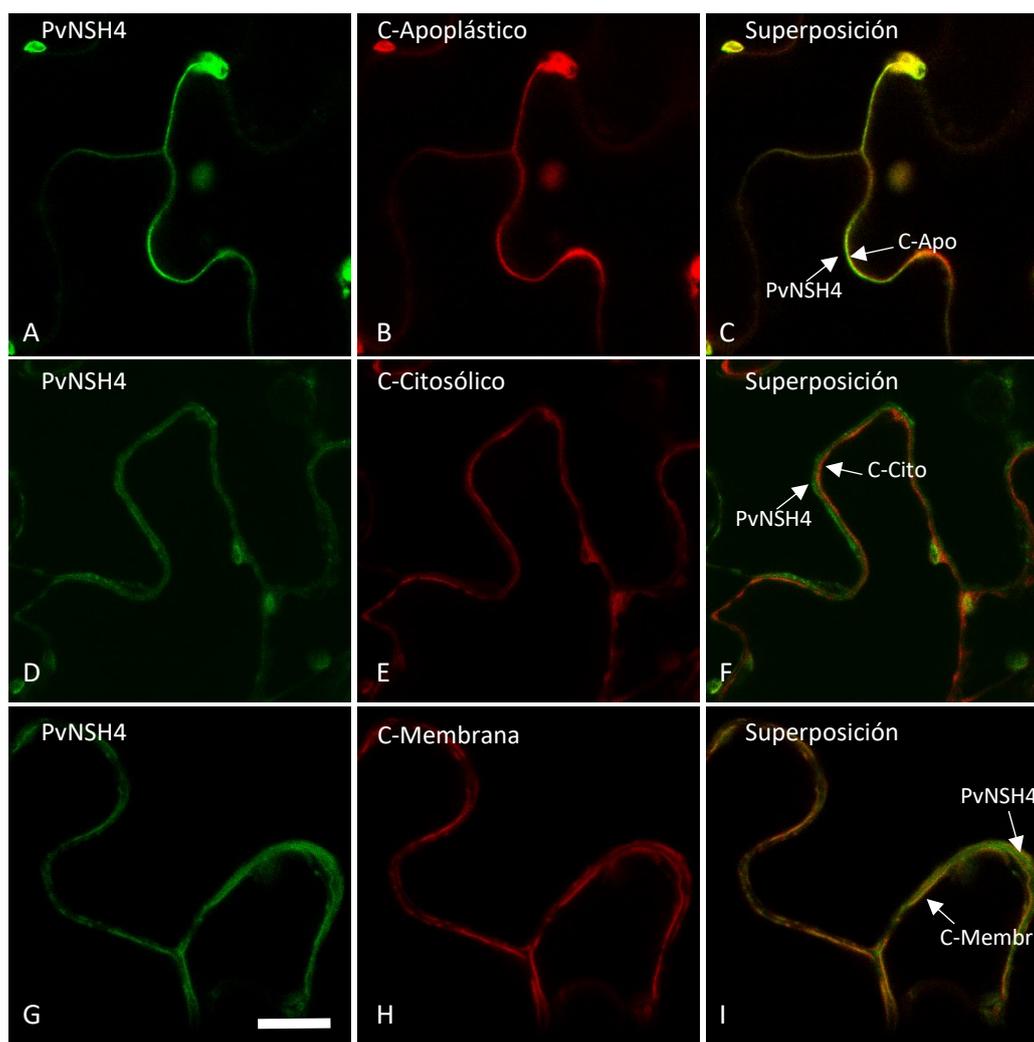


Figura 24. Localización subcelular de PvNSH4 en las células de la epidermis de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la proteína PvNSH4-eYFP (verde, primera columna) junto con cada uno de los controles: apoplástico (AT5G11420-mCherry), citosólica (AT4G25890.1-mCherry) y de membrana plasmática (AtPIP2A-mCherry) (roja, segunda columna) La tercera columna representa la superposición de PvNSH4-eYFP y el control correspondiente. Las flechas indican la localización de las proteínas. C-Apo: AT5G11420-mCherry C-Cito: AT4G25890.1-mCherry y C-Membr: AtPIP2A-mCherry. La barra de escala representa 15 μm en A-F y 10 μm en G-I.

La intensidad de la señal de fluorescencia de PvNSH3-eYFP fue más débil y difícil de observar que la de PvNSH4-eYFP, pero, como se observa en la Figura 25 (A-C), PvNSH3-eYFP también parece colocalizar con la señal del marcador apoplástico AT5G11420, mientras que no lo hizo con los marcadores citosólicos (Figura 25 D-F) ni de membrana plasmática (Figura 25 G-I), lo que sugiere que PvNSH3, al igual que PvNSH4, también se localiza en el espacio apoplástico.

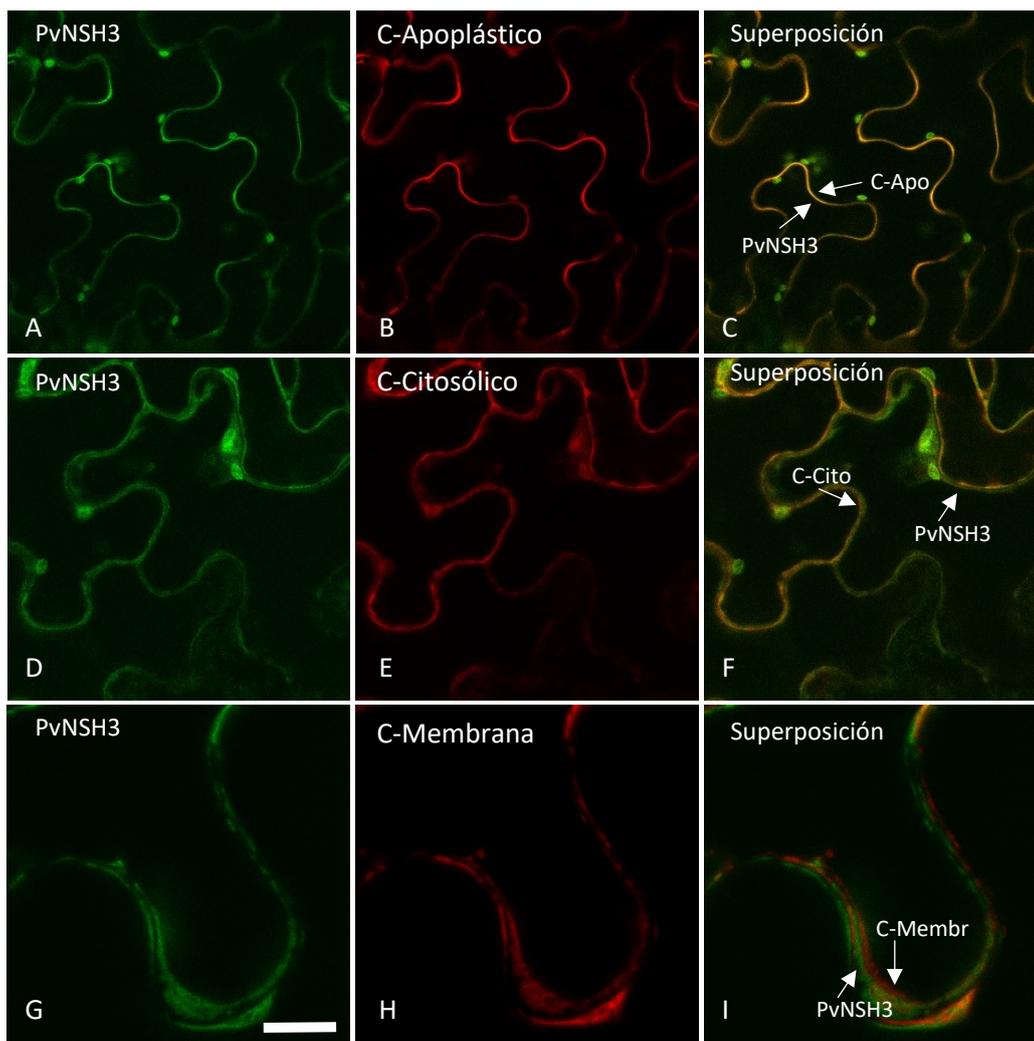


Figura 25. Localización subcelular de PvNSH3 en las células de la epidermis de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la proteína PvNSH3-eYFP (verde, primera columna) junto con cada uno de los controles: apoplástico (AT5G11420-mCherry), citosólica (AT4G25890.1-mCherry) y de membrana plasmática (AtPIP2A-mCherry) (roja, segunda columna). La tercera columna representa la superposición de PvNSH3-eYFP y el control correspondiente. Las flechas indican la localización de las proteínas. Las flechas indican la localización de las proteínas. C-Apo: AT5G11420-mCherry C-Cito: AT4G25890.1-mCherry y C-Membr: AtPIP2A-mCherry. La barra de escala representa 40 μm en A-C, 20 μm en D-F y 10 μm en G-I.

**CAPÍTULO III. REGULACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS CITOSÓLICAS DE
JUDÍA DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSGERMINATIVO**

3.1. Estudio de las nucleosidasas citosólicas de judía en cotiledones durante la germinación y desarrollo posgerminativo

Para estudiar cómo se regulan las nucleosidasas durante la germinación, el desarrollo posgerminativo temprano y la senescencia en cotiledones, se analizaron los niveles de expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2*, la actividad nucleosidasa con xantosina y uridina, y la abundancia de *PvNSH1* y 2. La expresión tanto de *PvNSH1* como *PvNSH2* se analizó mediante qRT-PCR y utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen (Materiales y Métodos 2). Tanto *PvNSH1* como *PvNSH2* se detectaron el primer día tras la imbibición (DDI), y su expresión aumento al tercer DDI, coincidiendo con la emergencia radicular (Figura 26A, B), sin que hubiese diferencias significativas entre los niveles de expresión de ambos genes. Una vez que la radícula fue visible el nivel de transcrito de ambos genes disminuyó.

La actividad nucleosidasa se ensayó con los extractos crudos utilizando xantosina y uridina como sustratos (Materiales y Métodos 23). Con xantosina, se detectó actividad en todas las muestras analizadas e, igual que ocurrió con los niveles de expresión, esta aumentó tras la emergencia radicular (tercer DDI). Sin embargo, al contrario de lo ocurrido con la acumulación de ARNm, la actividad nucleosidasa específica continuó aumentando hasta alcanzar un máximo a los ocho DDI, y se mantuvo en estos niveles hasta el décimo DDI, cuando los cotiledones ya estaban senescentes (Figura 26C, D). La actividad nucleosidasa también se ensayó con uridina mostrando una tendencia muy similar a la que se observó con xantosina, pero con valores de actividad específica considerablemente más bajos.

La inmunodetección se realizó utilizando anticuerpos policlonales anti*PvNSH1*, que mostraron reacción cruzada con *PvNSH2*. Se detectó acumulación de proteína a partir del segundo DDI, justo antes de la emergencia radicular, y esta fue mayor al cuarto DDI (Figura 26E) y se mantuvo alta durante la senescencia del cotiledón (Figura 26F).

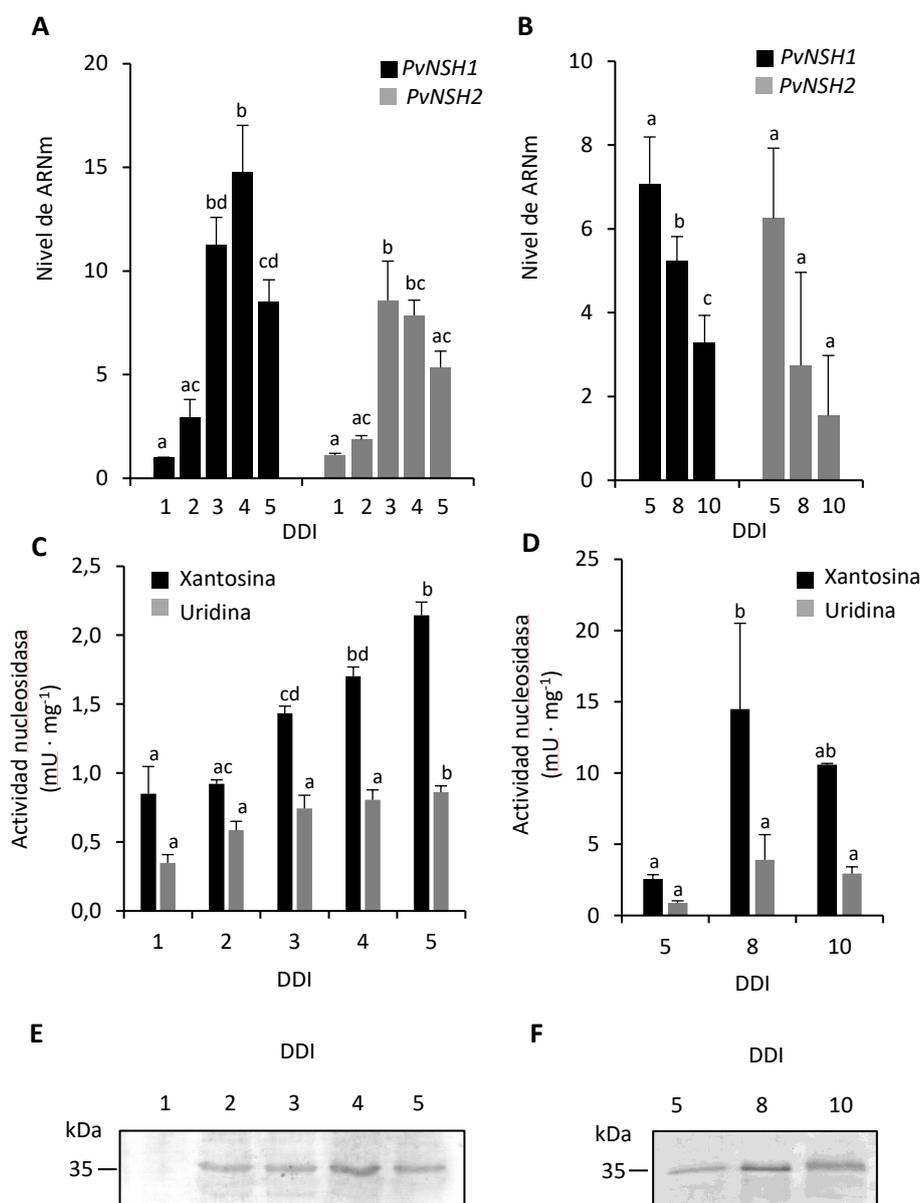


Figura 26. Regulación de las nucleosidasas durante la germinación y el desarrollo posgerminativo temprano en cotiledones. (A, B) Niveles de ARNm de *PvNSH1* y *PvNSH2*, (C, D) actividad nucleosidasa y (E, F) inmunodetección de nucleosidasas. Los resultados de qRT-PCR se normalizaron con la media geométrica de la expresión relativa de los genes *actina-2* y *ubiquitina*, y se expresaron con respecto a la expresión de *PvNSH1* en cotiledones de 1 DDI (días después de la imbibición) a la que se le atribuyó el valor de 1. La actividad nucleosidasa se llevó a cabo como se describe en los Materiales y Métodos 23, utilizando xantosina y uridina como sustratos. La inmunodetección de las nucleosidasas *PvNSH1* y *PvNSH2* se realizó con anticuerpos policlonales anti-*PvNSH1* (Materiales y Métodos 17). Se cargó la misma cantidad de proteína total (15 μ g) en todas las calles de los geles. Los valores representan el resultado de la media \pm SE de al menos tres replicas biológicas. Cada letra indica diferencias significativas entre los diferentes estados de desarrollo para un mismo gen o con el mismo sustrato, analizado con ANOVA y seguido de la prueba post-hoc de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.2. Estudio de las nucleosidasas citosólicas de judía en ejes embrionarios durante la germinación y desarrollo posgerminativo

El mismo tipo de análisis se llevó a cabo en ejes embrionarios. La radícula se diferenció del hipocótilo al cuarto DDI, por lo que la regulación de las nucleosidasas se analizó en el eje embrionario completo desde el primer hasta el tercer DDI, y en el hipocótilo y radícula por separado desde el cuarto al quinto DDI.

El patrón de expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2* en ejes embrionarios siguió una tendencia similar a la observada en cotiledones, en la que ambos genes alcanzaron un máximo entre el segundo y tercer DDI (Figura 27A). La actividad nucleosidasa fue mayor en ejes embrionarios que en cotiledones, y tanto la actividad como la acumulación de proteína también aumentaron tras la emergencia radicular (Figura 27B, C). En el análisis mediante inmunodetección, además de la señal más intensa, también se detectaron otras bandas menos intensas justo por encima y debajo de la principal que, aunque el anticuerpo antiPvNSH1 presenta reacción cruzada con PvNSH2, no podemos descartar que estas bandas más tenues se correspondan a las distintas nucleosidasas o a diferentes modificaciones postraduccionales de PvNSH1 y 2. El hipocótilo y la radícula al cuarto DDI mostraron una acumulación de ARNm similar al de los ejes embrionarios del tercer DDI. Sin embargo, al quinto DDI, el nivel de transcrito y la actividad nucleosidasa parecen disminuir en el hipocótilo (Figuran 27A, B).

Al igual que lo observado en cotiledones, la actividad nucleosidasa con uridina también mostró una tendencia similar a la que se observó con xantosina, pero la reducción de la actividad fue considerablemente más significativa que en cotiledones (Figuras 26 y 27).

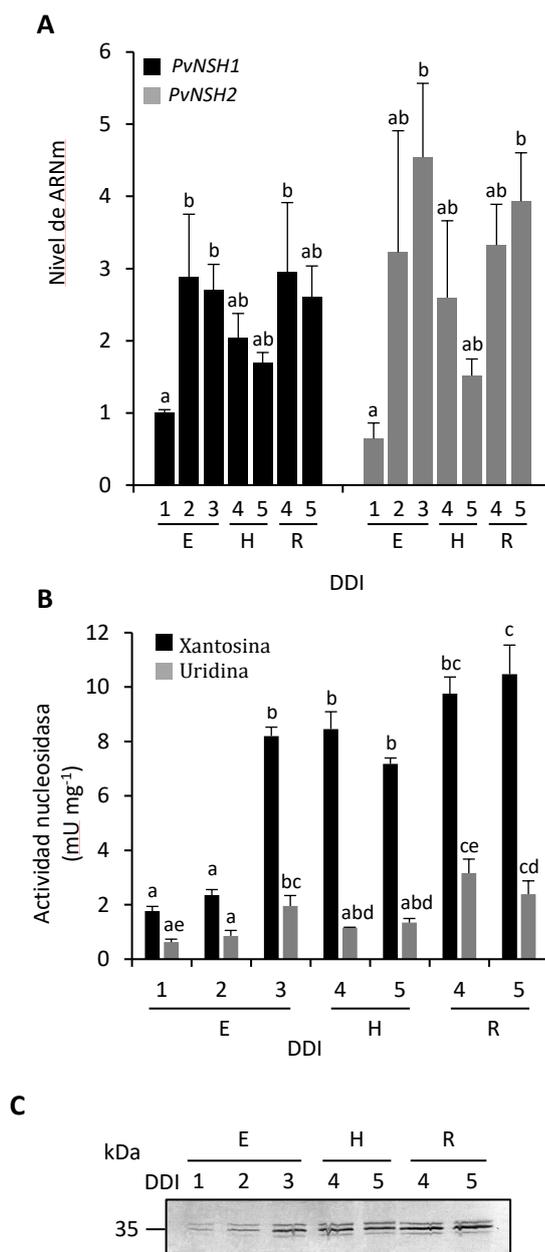


Figura 27. Regulación de las nucleosidasas durante la germinación y desarrollo posgerminativo temprano en ejes embrionarios, hipocotilo y radícula. (A) Evolución de los niveles de ARNm de *PvNSH1* y *PvNSH2*, (B) actividad nucleosidasa y (C) inmunodetección de nucleosidasas durante la germinación y desarrollo postgerminativo. Los resultados de qRT-PCR se normalizaron con la media geométrica de la expresión de los genes *actina-2* y *ubiquitina*, y se expresaron con respecto a la expresión de *PvNSH1* en ejes del primer DDI (días después de la imbibición), a la que se le atribuyó el valor de 1. La actividad nucleosidasa se ensayó como se describe en Materiales y Métodos 23, utilizando xantosina y uridina como sustratos. La inmunodetección de *PvNSH1* y *PvNSH2* se realizó con anticuerpos policlonales anti-*PvNSH1* (Materiales y Métodos 17). Se cargó la misma cantidad de proteína total (15 μ g) en todas las calles de los geles. Los valores representan la media \pm SE de, al menos, tres réplicas biológicas. Cada letra indica diferencias significativas entre los diferentes estados de desarrollo para un mismo gen o sustrato, analizado con ANOVA y seguido de la prueba post-hoc de Tukey ($P \leq 0.05$). E: ejes embrionarios; H: hipocotilo; R: radícula.

3.3. Actividad nucleasa durante la germinación y desarrollo posgerminativo temprano

Para estudiar la relación entre la inducción de las nucleosidasas y la degradación de ácidos nucleicos se determinó la actividad nucleasa in vitro en cotiledones y ejes durante la germinación, desarrollo posgerminativo temprano y senescencia. La actividad ssADNasa en cotiledones aumentó tras la emergencia radicular y no hubo cambios significativos durante la fase de movilización de nutrientes y en las fases de senescencia de cotiledones (Figura 28A, B). En ejes embrionarios, la actividad ssADNasa también aumento tras la emergencia radicular (Figura 28C). La actividad en hipocótilo al cuarto, y quinto DDI parece ser mayor que en radícula.

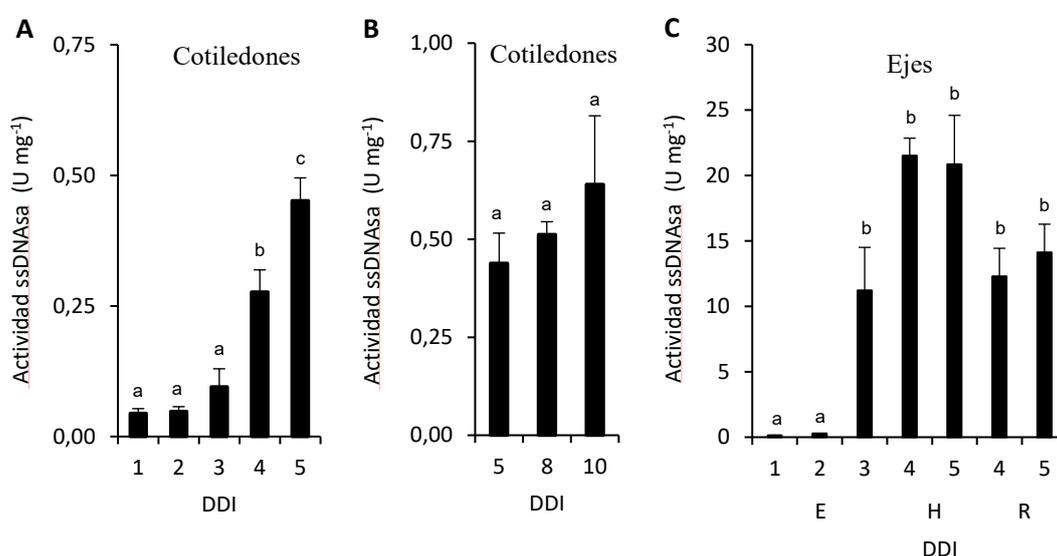


Figura 28. Degradación de ácidos nucleicos durante la germinación y desarrollo posgerminativo en judía. La actividad ssADNasa (Materiales y Métodos 24) se determinó en cotiledones (A, B) y ejes embrionarios (C). Los valores representan la media \pm SE de, al menos, tres réplicas biológicas, con dos réplicas técnicas por experimento. Las letras indican diferencias significativas a lo largo de los diferentes estados de desarrollo. Los datos se analizaron mediante ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey ($P \leq 0.05$). DDI: días tras la imbibición; E: ejes embrionarios; H: hipocotilo; R: radícula.

3.4. Acumulación de ureidos durante la germinación y desarrollo posgerminativo temprano

Finalmente, también se determinó la concentración de ureidos totales en cotiledones y ejes embrionarios durante la germinación y el desarrollo posgerminativo. Para ello se determinaron las concentraciones de ureidos totales en extractos crudos (Materiales y Métodos 26.1), para cada uno de los tejidos de plántulas de judía. En cotiledones, la concentración de ureidos no varió significativamente durante la germinación, pero

disminuyó durante la senescencia de los cotiledones (Figura 29A, B). Sin embargo, en ejes embrionarios la cantidad de ureidos aumentó significativamente al segundo y tercer DDI (Figura 29C). Este incremento continuó en el hipocótilo mientras que disminuyó en radículas.

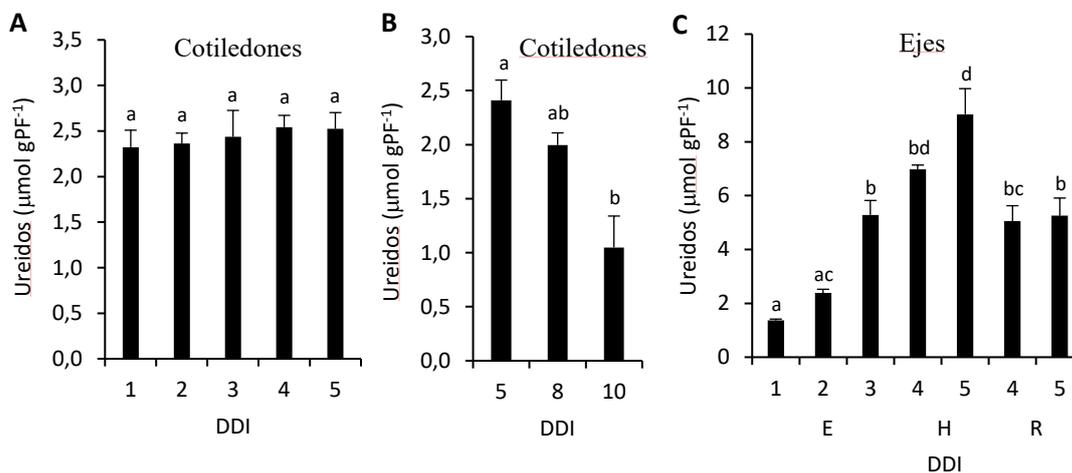


Figura 29. Acumulación de ureidos durante la germinación y desarrollo posgerminativo en judía. Los ureidos se determinaron en cotiledones (A, B) y ejes embrionarios (C). Los valores representan la media \pm SE de, al menos, tres replicas biológicas. Las letras indican diferencias significativas entre los diferentes estados de desarrollo. Los datos se analizaron con ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey ($P \leq 0.05$). DDI: días después la imbibición; E: ejes embrionarios; H: hipocotilo; R: radícula.

3.5. Contenido de nucleósidos y nucleobases durante la germinación y el desarrollo posgerminativo

La distribución de nucleósidos y nucleobases durante la germinación y el desarrollo posgerminativo se cuantificó mediante HPLC-MS en cotiledones y ejes embrionarios (Materiales y Métodos 26.2). En cotiledones, la adenosina fue el nucleósido más abundante, seguido de guanósina, sin detectarse cambios significativos desde el primer al quinto DDI (Tabla 11A). De los sustratos por los que las nucleosidasas presentaron mayor afinidad, el más abundante fue la uridina, la cual disminuyó a partir del segundo DDI, mientras que la xantósina fue detectable solo en el primer DDI, y la concentración de inosina estuvo por debajo del límite de detección. Adenina, uracilo y xantina fueron las únicas nucleobases detectadas, de las cuales la xantina fue la más abundante. La adenina disminuyó a partir del quinto DDI, el uracilo solo se detectó al primer DDI, mientras que la xantina fue indetectable a partir del segundo DDI. La concentración de adenina y

uracilo fue significativamente inferior a la de sus correspondientes nucleósidos, mientras que la concentración de xantina fue similar a la de xantosina.

En ejes embrionarios, el nucleósido más abundante también fue la adenosina, seguida de guanosina y uridina (Tabla 11B). Estos tres nucleósidos fueron aumentando desde el primer al tercer DDI, tendencia que fue mayor para la adenosina. Cuando se diferenció el hipocotilo de la radícula, el nivel de los nucleósidos se mantuvo estable en el hipocótulo, mientras que disminuyó en radículas. La xantosina fue el único nucleósido que se detectó al primer DDI en los ejes embrionarios. La adenina y la xantina se detectaron en ejes embrionarios al mismo nivel y distribución que en los cotiledones.

Tabla 11. Análisis de nucleósidos y nucleobases en cotiledones y ejes embrionarios de judía.

A) Cotiledones					
Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{gPF}^{-1}$)					
	1 DDI	2 DDI	3 DDI	4 DDI	5 DDI
Xantosina	$7,2 \pm 2,0$	-	-	-	-
Inosina	-	-	-	-	-
Uridina	$11,8 \pm 0,5^a$	$5,7 \pm 0,1^b$	$8,1 \pm 0,7^b$	$5,4 \pm 0,56^b$	$5,9 \pm 0,6^b$
Adenosina	$91,0 \pm 6,3^a$	$78,7 \pm 3,0^a$	$80,2 \pm 3,9^a$	$75,3 \pm 5,8^a$	$77,4 \pm 4,1^a$
Guanosina	$18,0 \pm 1,1^a$	$21,0 \pm 1,3^a$	$22,8 \pm 1,5^a$	$21,3 \pm 1,7^a$	$22,5 \pm 1,5^a$
Timidina	-	-	-	-	-
Citidina	$0,8 \pm 0,1^a$	$1,1 \pm 0,1^{ab}$	$1,5 \pm 0,2^b$	$0,9 \pm 0,1^a$	$1,2 \pm 0,1^{ab}$
Xantina	$10,2 \pm 0,9^a$	$11,5 \pm 3,5^a$			
Hipoxantina	-	-	-	-	-
Uracilo	$1,8 \pm 0,4$	-	-	-	-
Adenina	$1,9 \pm 0,0^{ac}$	$2,2 \pm 0,1^{ab}$	$2,9 \pm 0,1^b$	$1,8 \pm 0,3^{ac}$	$1,4 \pm 0,1^c$
Guanina	-	-	-	-	-
Timina	-	-	-	-	-
Citosina	-	-	-	-	-

B) Ejes embrionarios, Hipocotilo y Radícula							
Concentración de metabolitos ($\mu\text{g}\cdot\text{gPF}^{-1}$)							
	Ejes			Hipocotilo		Radículas	
	1 DDI	2 DDI	3 DDI	4 DDI	5 DDI	4 DDI	5 DDI
Xantosina	5,8 ± 1,0	-	-	-	-	-	-
Inosina	-	-	-	-	-	-	-
Uridina	5,2 ± 0,6 ^a	9,4 ± 0,3 ^a	23,5 ± 1,4 ^b	23,45 ± 1,7 ^b	24,7 ± 1,8 ^b	11,2 ± 0,3 ^a	12,3 ± 2,9 ^a
Adenosina	42,4 ± 6,1 ^a	76,1 ± 3,2 ^{ab}	163,3 ± 22,7 ^b	155,6 ± 22,9 ^b	159,4 ± 27,2 ^b	78,5 ± 20,6 ^{ab}	81,1 ± 32,2 ^{ab}
Guanosina	42,9 ± 6,7 ^a	50,0 ± 1,4 ^a	139,4 ± 6,5 ^b	129,2 ± 12,8 ^b	127,8 ± 18,6 ^b	64,9 ± 8,5 ^a	56,37 ± 17,7 ^a
Timidina	-	-	-	-	-	-	-
Citidina	2,1 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,3 ^{ab}	7,9 ± 1,3 ^{ab}	9,4 ± 1,2 ^{ab}	10,1 ± 2,6 ^b	4,5 ± 1,0 ^{ab}	6,5 ± 2,4 ^{ab}
Xantina	8,0 ± 1,8	9,3 ± 2,2	-	-	-	-	-
Hipoxantina	-	-	-	-	-	-	-
Uracilo	-	-	-	-	-	-	-
Adenina	1,3 ± 0,2 ^a	3,7 ± 0,2 ^b	3,1 ± 0,3 ^{ab}	2,1 ± 0,1 ^{ab}	1,9 ± 0,0 ^{ab}	1,5 ± 0,0 ^a	3,2 ± 1,1 ^{ab}
Guanina	-	-	0,6 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,6 ^a	-	0,9 ± 0,3 ^a
Timina	-	-	-	-	-	-	-
Citosina	-	-	-	-	-	-	-

Los metabolitos se determinaron en extractos de tejidos a los días tras la imbibición indicados. Los datos muestran la media ± SD ($3 \leq n \leq 12$). Las letras indican diferencias significativas en los diferentes estados de desarrollo analizados. Los datos se analizaron mediante ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$). El símbolo – significa que dichos metabolitos estaban por debajo del límite de detección.

**CAPÍTULO IV. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS NUCLEOSIDASAS DE JUDÍA
EN PLANTAS ADULTAS CULTIVADAS EN CONDICIONES DE FIJACIÓN
BIOLÓGICA DE NITRÓGENO**

4.1. Regulación de las nucleosidasas de judía en plantas adultas en condiciones de fijación biológica de nitrógeno (FBN) y fertilizadas con nitrato

Para estudiar cómo se regulan las nucleosidasas en plantas adultas se analizaron los niveles de expresión de las cuatro nucleosidasas, la actividad nucleosidasa citosólica y la abundancia de *PvNSH1* y 2 en distintos tejidos (nódulos, raíz, tallo y tercera hoja trifoliada), tanto en condiciones de fijación biológica de nitrógeno (FBN) como en plantas fertilizadas con nitrato.

En primer lugar, se analizó la expresión de los genes que codifican nucleosidasas mediante qRT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen (Materiales y Métodos 2). En las plantas fertilizadas con nitrato, *PvNSH1* se expresó en todos los tejidos analizados, aunque la acumulación de transcrito fue algo más elevada en hojas, seguida de raíces, y muy baja en tallo (Figura 30A). En condiciones de FBN, los niveles de expresión de *PvNSH1* fueron superiores en la raíz, seguido de hojas y más bajos en tallos. Resaltar que la expresión de *PvNSH1* en raíz fue superior en plantas cultivadas en condiciones de FBN que en las fertilizadas con nitrato. La expresión de *PvNSH1* en los nódulos de las plantas que crecían en condiciones de FBN fue más elevada que en cualquiera de los demás tejidos analizados (2 y 3,5 veces mayor que en raíz y hoja respectivamente).

Por otro lado, la expresión de *PvNSH2* siguió un patrón similar a *PvNSH1*, aunque los niveles de expresión en hojas fueron sensiblemente inferiores a los de *PvNSH1*. La expresión de *PvNSH2* en nódulos también fue superior a la del resto de tejidos, y similar a la de *PvNSH1* (3,5 veces más transcrito que en raíz) (Figura 30B).

El análisis de la expresión de las nucleosidasas apoplásticas, *PvNSH3* y *PvNSH4*, mostró niveles de expresión que rondaron el límite de linealidad en la mayoría de tejidos, y muy inferiores a los de *PvNSH1* y *PvNSH2*, sin observarse diferencias significativas entre los distintos tejidos.

Para determinar si el nivel de actividad nucleosidasa en los distintos tejidos de judía seguía un patrón similar al de los niveles de transcrito se ensayó la actividad nucleosidasa con cada uno de los extractos crudos de los diferentes tejidos, y utilizando xantosina y uridina como sustratos (Materiales y Métodos 23). En las plantas fertilizadas con nitrato, la actividad con xantosina fue mayor en raíz, y bastante inferior en tallo y en hoja (Figura 30C). En el caso de las plantas que dependieron de la FBN, la actividad con xantosina fue

mayor en nódulos (algo más del doble que en raíces). En el resto de tejidos, los niveles de actividad fueron similares a los de las plantas fertilizadas con nitrato, excepto en raíz

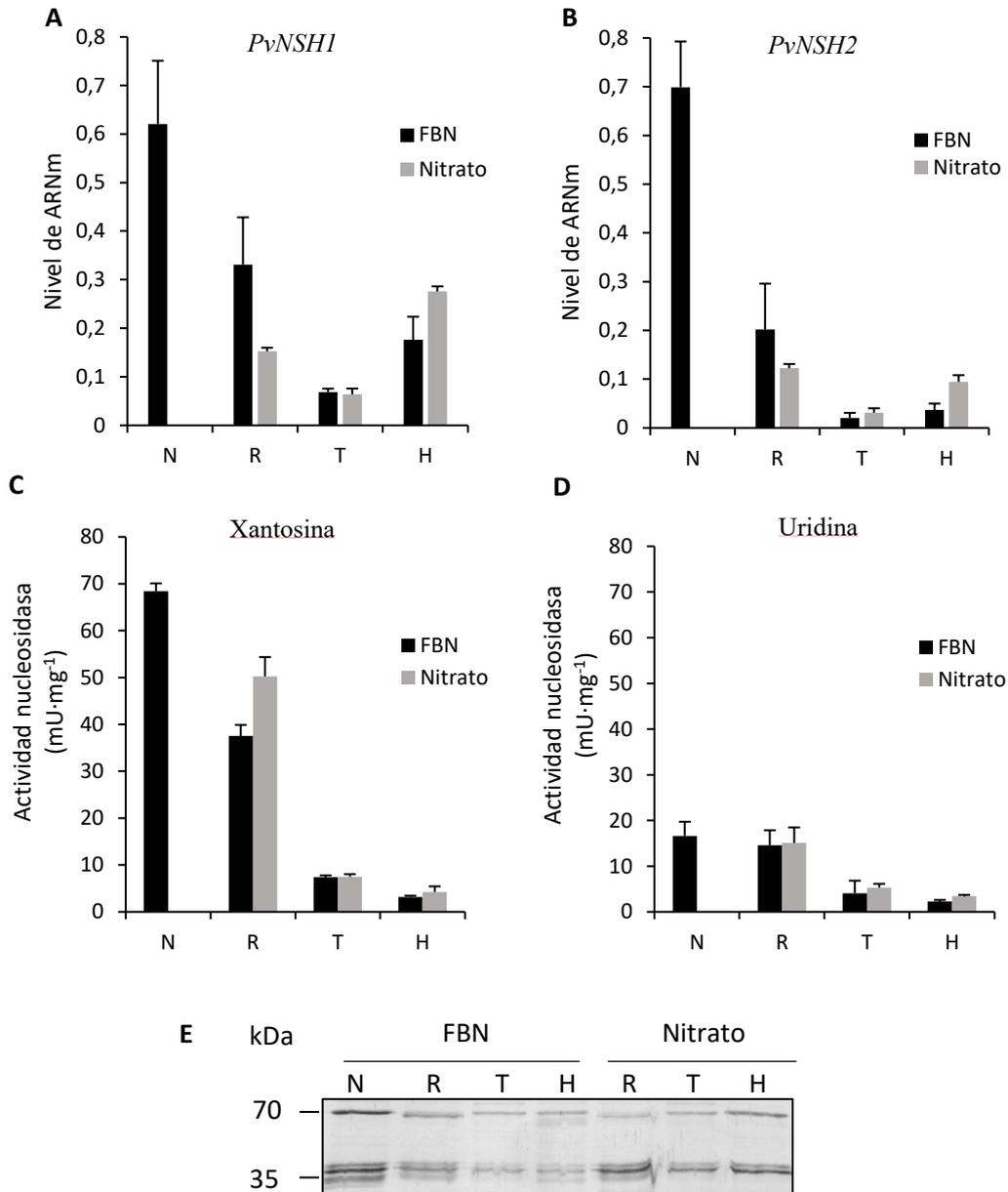


Figura 30. Regulación de las nucleosidasas PvNSH1 y PvNSH2 en plantas de judía cultivadas en condiciones de FBN y fertilizadas con nitrato. (A, B) Niveles de ARNm de *PvNSH1* (A) y *PvNSH2* (B), (C, D) actividad nucleosidasa y (E) inmunodetección de nucleosidasas. Los resultados de qRT-PCR se normalizaron con la media geométrica de la expresión de los genes *actina-2* y *ubiquitina* y se expresaron con respecto a la expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2*. La actividad nucleosidasa se ensayó como se describe en Materiales y Métodos 23, utilizando xantosina (C) y uridina (D) como sustratos. La inmunodetección de *PvNSH1* y *PvNSH2* se realizó con anticuerpos policlonales anti-*PvNSH1* (Materiales y Métodos 17). Se cargó la misma cantidad de proteína (20 μ g) en todas las calles de los geles. Los valores representan la media \pm SE de al menos, tres replicas biológicas. N: nódulos; R: raíz; T: tallo; H: tercera hoja trifoliada.

donde la actividad fue algo inferior a la de las plantas fertilizadas con nitrato. Cuando se ensayó la actividad con uridina, el patrón fue muy similar al que observamos con xantosina, con la diferencia de que la actividad en nódulos y en raíces fueron similares y significativamente inferiores a los obtenidos con xantosina (Figura 30D).

La inmunodetección con anticuerpos policlonales antiPvNSH1 mostró una banda mayoritaria de alrededor de 35 kDa en todos los tejidos, tanto en las plantas que dependieron de la FBN como en las fertilizadas con nitrato, que se corresponde con el tamaño predicho de PvNSH1 y PvNSH2 (35,6 y 34,6 kDa, respectivamente) (Figura 30E). En las plantas que dependieron de la FBN la señal fue mucho más intensa en nódulos seguida de raíces, mientras que en las plantas fertilizadas con nitrato la señal fue más intensa en raíces y hojas. Además, en todos los tejidos analizados y en ambas condiciones se detectó una señal más débil flanqueando a la señal principal, que podría ser debido a reacción cruzada con PvNSH2 (los anticuerpos policlonales antiNSH1 presentan reacción cruzada con PvNSH2) o a diferentes modificaciones postraduccionales de PvNSH1 y PvNSH2, y una banda de aproximadamente 70 kDa que podría corresponderse con agregados de PvNSH1 y/o PvNSH2.

4.2. Estudio del papel de las nucleosidasas PvNSH1 y PvNSH2 en el metabolismo de ureidos en plantas cultivadas en condiciones de FBN

El análisis de la regulación de PvNSH1 y PvNSH2 en plantas cultivadas en condiciones de FBN sugirió un papel relevante de estas enzimas en los nódulos, estructuras en las que se produce la síntesis *de novo* de ureidos. Puesto que las nucleosidasas intervienen en la hidrólisis de xantosina dando lugar a xantina, el sustrato de partida de la ruta de síntesis de ureidos se procedió a estudiar en más profundidad el papel de estas nucleosidasas en el metabolismo de ureidos. Para ello, se diseñaron dos plásmidos de ARNi para el silenciamiento de PvNSH1. Uno de ellos, contenía un fragmento de 281 nucleótidos del extremo 3', que incluía 155 nucleótidos de la región 3'UTR de *PvNSH1* (ARNi-sil1), y el otro un fragmento de 351 nucleótidos de una región más central y con mayor similitud con *PvNSH2* (ARNi-sil12) (Materiales y Métodos 28.1). Con estas construcciones se transformaron raíces aéreas y se hicieron nodular para que su crecimiento dependiese de la FBN (Materiales y Métodos 28.2).

Como se muestra en la figura 31A el nivel de expresión de *PvNSH1* en raíces de las plantas transformadas con el ARNi-sil1 se redujo un 40 %, mientras que en las transformadas con el ARNi-sil12 el efecto fue mayor, con una reducción de los niveles de transcritos del 70 % con respecto al de las plantas control. También se observó una reducción de la expresión de *PvNSH2* (Figura 30B), con un patrón similar al de *PvNSH1*. Sin embargo, en el caso de *PvNSH2* las diferencias no fueron significativas debido a la gran variabilidad detectada en la situación control.

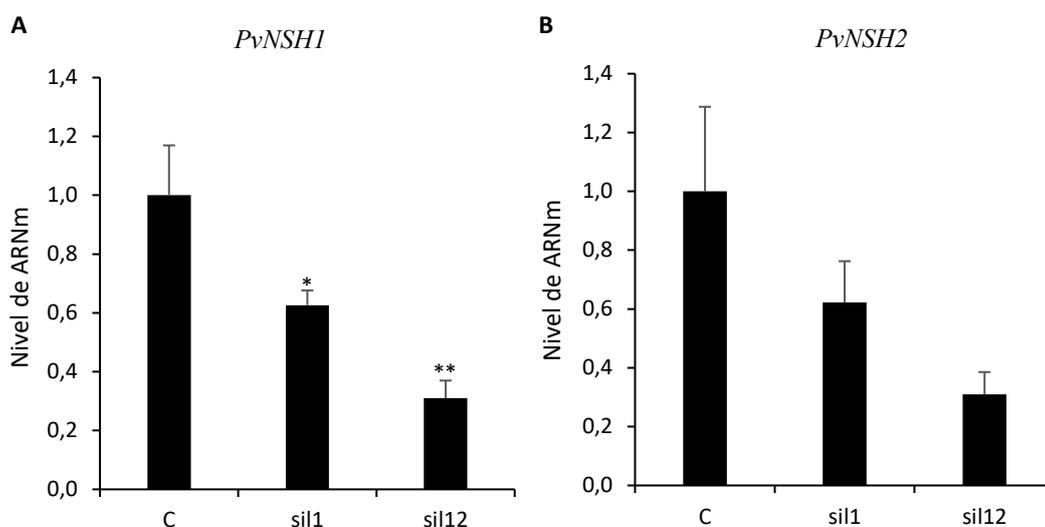


Figura 31. Expresión relativa de los genes *PvNSH1* (A) y *PvNSH2* (B) en raíces aéreas de plantas de judía transformadas con las construcciones de silenciamiento ARNi-sil1 y ARNi-sil12. Los resultados de qRT-PCR se normalizaron con la media geométrica de la expresión de los genes *actina-2* y *ubiquitina*, y se expresaron con respecto a la expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2* en las muestras control, a las que se le asignó el valor de 1. Los valores representan el resultado de la media \pm SE de, al menos, cinco replicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control de acuerdo con la prueba t de Student $P \leq 0,05$ (*) o $\leq 0,01$ (**). C: control, sil1: construcción ARNi-sil1, sil12: construcción ARNi-sil12.

Para determinar si la reducción de la expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2* en raíces afectaba a los niveles de actividad nucleosidasa, se analizó dicha actividad en las raíces transformadas y en los nódulos formados en dichas raíces, utilizando xantosina como sustrato (Figura 31). La actividad nucleosidasa fue un 16 % inferior en las raíces transformadas con el ARNi-sil1, y un 70 % inferior en las transformadas con ARNi-sil12 (Figura 32A). En nódulos de las raíces transformadas con el ARNi-sil1, la actividad nucleosidasa fue similar a la de los nódulos de raíces no transformadas, mientras que en los de las raíces transformadas con el ARNi-sil12 esta se redujo un 50 % aproximadamente.

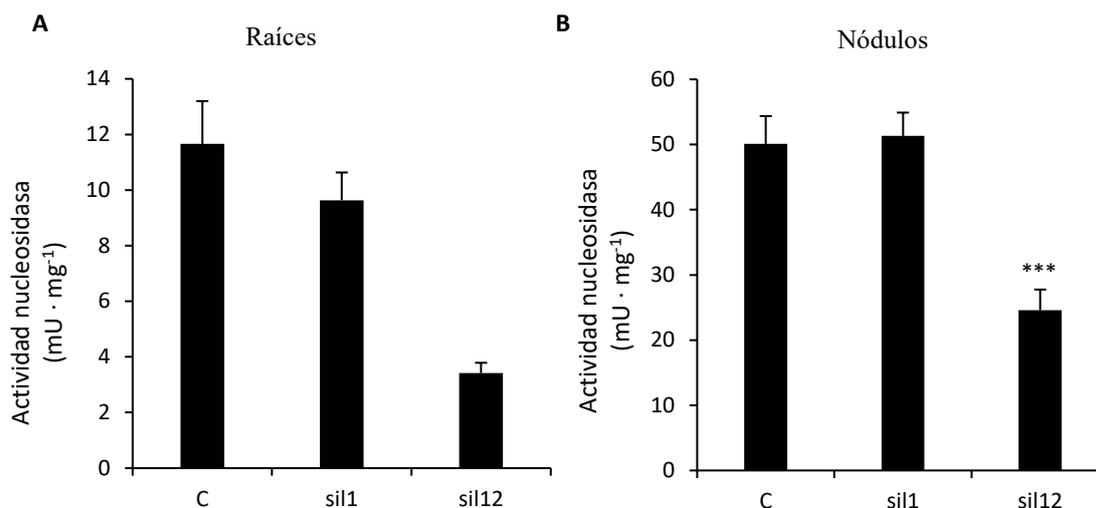


Figura 31. Actividad nucleosidasa en raíces aéreas (A) y nódulos procedentes de dichas raíces (B) de plantas de judía transformadas con las construcciones de silenciamiento ARNi-sil1 y ARNi-sil12. La actividad nucleosidasa se ensayó como se describe en Materiales y Métodos 23, utilizando xantosina como sustrato. Los valores representan la media \pm SE de, al menos, cinco réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control de acuerdo con la prueba t de Student. $\leq 0,001$ (***) . C: control, sil1: construcción RNAi-sil1, sil12: construcción RNAi-sil12.

Puesto que los nódulos son orgánulos en los que se produce la síntesis *de novo* de ureidos, y la xantina es el sustrato de partida para la síntesis de ureidos, se evaluó si la reducción en la actividad nucleosidasa en nódulos de raíces transformadas con las construcciones de silenciamiento alteraban el contenido en ureidos en raíces transformadas y en nódulos procedentes de dichas raíces.

Como se observa en la figura 33A, la concentración de ureidos en las raíces transformadas con el ARNi-sil1 no varió significativamente, mientras que en las raíces transformadas con ARNi-sil12 se redujo en un 20 %, aunque la diferencias no fueron estadísticamente significativas. En nódulos de las raíces transformadas con el ARNi-sil1, los niveles de ureidos fueron similares a los de las plantas no transformadas, mientras que en los de las raíces transformadas con ARNi-sil12 fueron ligeramente superiores, aunque la diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas (Figura 33B).

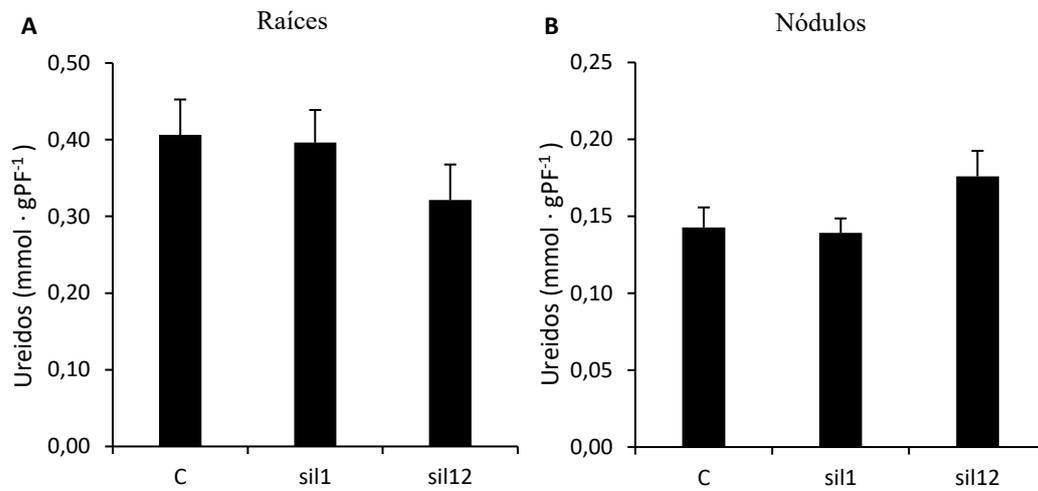


Figura 33. Acumulación de ureidos en raíces aéreas (A) y nódulos (B) de plantas de judía transformadas con las construcciones de silenciamiento ARNi-sil1 y ARNi-sil12. La determinación de ureidos se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos 26.1. Los valores representan la media \pm SE de, al menos, cinco replicas biológicas. C: control, sil1: construcción ARNi- sil1, sil12: construcción RNi- sil1-2.

**CAPÍTULO V. REGULACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS APOPLÁSTICAS
DURANTE LA RESPUESTA A DISTINTOS ESTRESSES**

5.1. Estudio de las nucleosidasas *PvNSH3* y *PvNSH4* en respuesta a diferentes hormonas y estreses

El análisis de las regiones promotoras de *PvNSH3* y *PvNSH4* sugirió que ambos genes podrían participar en procesos relacionados con la respuesta a distintos tipos de estreses (Figura 18), por lo que, con el fin de obtener información sobre las posibles funciones de ambos genes, se analizó su expresión y la actividad nucleosidasa en radículas de judía en respuesta a tratamientos con distintas hormonas (SA 200 μ M, MJ 250 μ M, GA 50 μ M y ABA 50 μ M) o sus precursores (ACC 10 μ M), así como tras su exposición a estrés térmico (40 $^{\circ}$ C y 4 $^{\circ}$ C). Como se observa en la figura 34A la expresión de *PvNSH4* aumentó significativamente en raíces tratadas con MJ (casi 3,5 veces mayor que el control), mientras que el resto de los tratamientos no causó ningún efecto significativo. En concordancia con el aumento de la expresión de *PvNSH4*, la actividad nucleosidasa apoplástica también se triplicó en las radículas tratadas con MJ (Figura 34B). En cuanto a *PvNSH3*, sus niveles rondaron el límite de linealidad tanto en las radículas de las plantas control como en las tratadas (Figura 34A), y no se detectaron diferencias significativas entre ellos.

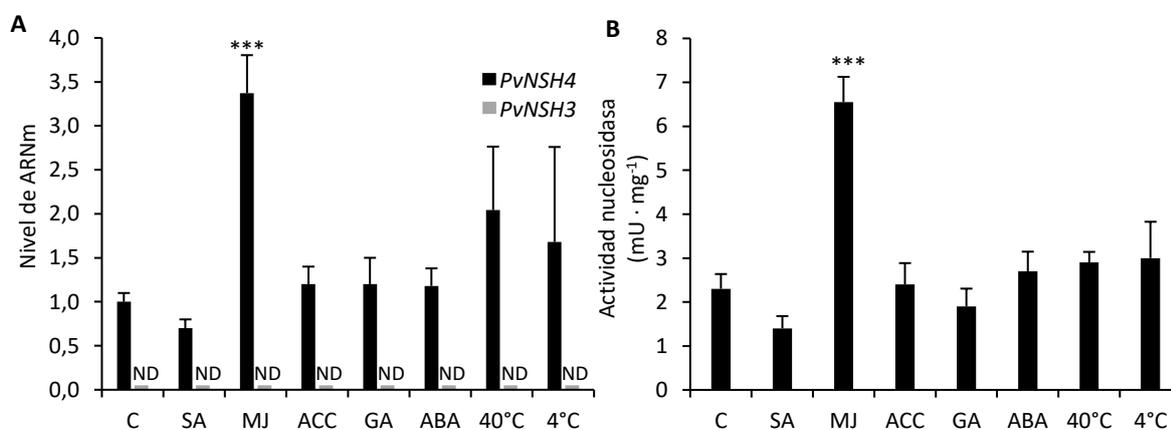


Figura 34. Regulación de las nucleosidasas *PvNSH3* y *PvNSH4* en respuesta a distintos tratamientos relacionados con estrés. (A) Niveles de ARNm de *PvNSH3* y *PvNSH4*, (B) actividad nucleosidasa apoplástica. Plántulas de judía de 5 DDI se trataron con distintas hormonas y sus precursores durante 24 h y se incubaron a 40 $^{\circ}$ C y 4 $^{\circ}$ C durante 2 y 4 h, respectivamente. Los resultados de qRT-PCR se normalizaron con la media geométrica de la expresión de los genes *actina-2* y *ubiquitina*, y se expresaron con respecto a la expresión de *PvNSH4* en radículas control, a la que se le atribuyó el valor de 1. La actividad nucleosidasa apoplástica se determinó como se describe en Materiales y Métodos 23. Se utilizaron 10 μ l de extracto crudo, inosina como sustrato y el ensayo se realizó a pH 5. Los valores representan la media \pm SE de cinco muestras de radículas. C: control, SA: 200 μ M ácido salicílico, MJ: 250 μ M metil jasmonato, ACC: 10 μ M ácido carboxílico 1-amino-ciclo-propano, GA: 50 μ M giberelina A3, ABA: 50 μ M ácido abscísico. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control de acuerdo con la prueba t de Student $P \leq 0,001$ (***)

A continuación, se analizó si la inducción de *PvNSH4* por MJ era específica de radícula, o se producía en otros tejidos de la plántula. Para ello, se analizó su nivel de expresión de en cotiledones y ejes de la plántula de judía tratados con MJ 250 μ M durante 24 h. Como muestra la Figura 35, solo se detectó inducción de *PvNSH4* en respuesta a MJ en radículas.

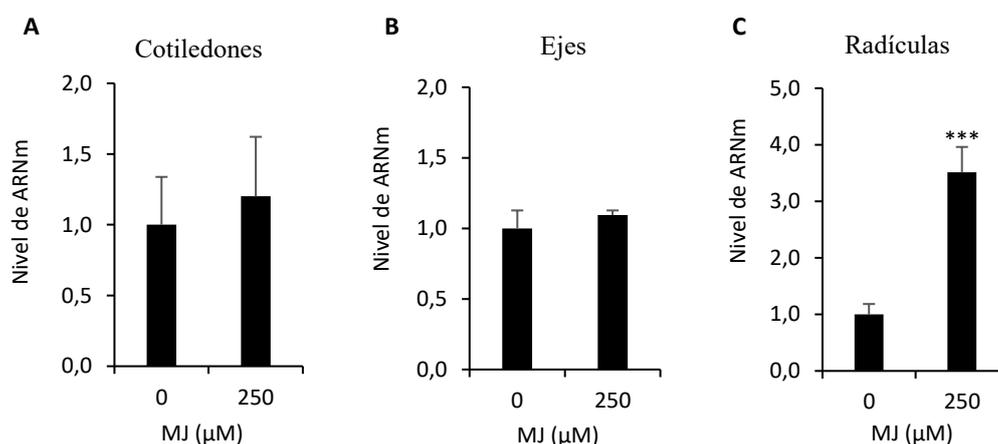


Figura 35. Expresión relativa de *PvNSH4* en cotiledones, ejes y radículas de plántulas de judía en respuesta a metil jasmonato (MJ). Plántulas de judía de 5 DDI se incubaron con 250 μ M MJ. Tras 24 horas, se separaron los cotiledones (A), el eje (B) y la radícula (C). Se analizó la expresión de *PvNSH4* mediante qRT-PCR. Los resultados se normalizaron con la media geométrica de la expresión de los genes *actina-2* y *ubiquitina*, y se expresaron con respecto a la expresión de *PvNSH4* en el tejido no tratado, al que se le atribuyó el valor de 1. Los valores representan la media \pm SE de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control de acuerdo con la prueba t de Student $P \leq 0,001$ (***)).

5.2. Validación del ensayo de actividad nucleosidasa apoplástica en extractos crudos

En el apartado anterior, la actividad nucleosidasa apoplástica se ensayó en extractos crudos a pH 5, un valor de pH en el que la nucleosidasa citosólica *PvNSH1* apenas presenta actividad (7 % de la actividad a pH 8). Además, se utilizó inosina como sustrato, el nucleósido por el que *PvNSH4* presenta la máxima actividad y por el que tanto *PvNSH1* como *PvNSH2* presentan una actividad reducida (Tablas 3 y 4). Por ello, se asumió que la actividad detectada era, principalmente, apoplástica. Para confirmarlo, se comparó dicha actividad con la presente en fluidos apoplásticos de radículas no tratadas y tratadas con 250 μ M de MJ. La actividad nucleosidasa con inosina aumentó de manera similar cuando se ensayó en extractos crudos (3 veces) (Figura 36A) como en fluido apoplástico (3,5 veces) (Figura 36B), si bien, la actividad específica detectada en el fluido apoplástico fue superior a la detectada en extractos crudos. Sin embargo, cuando la actividad se

ensayó con xantosina, un sustrato por el que las nucleosidasas citosólicas presentan alta afinidad y PvNSH4 baja, tanto en extractos crudos como en el fluido apoplástico la actividad fue aproximadamente un 40 % de la obtenida con inosina, y no varió significativamente tras el tratamiento con MJ. Estos resultados sugieren que el ensayo de actividad nucleosidasa utilizando extractos crudos a pH 5 e inosina detecta, principalmente, actividad apoplástica.

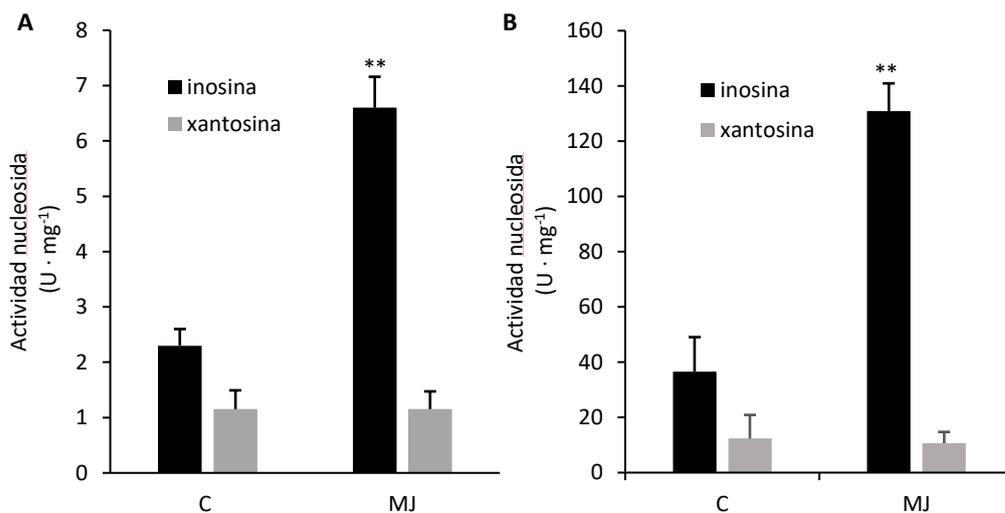


Figura 36. Actividad nucleosidasa en extractos crudos (A) y fluido apoplástico (B) de radículas de judía. La extracción de fluido apoplástico se realizó como se describe en materiales y métodos 27 con radículas de 5 DDI, que habían sido tratadas con MJ durante 24 h. El ensayo enzimático (materiales y métodos 23) se llevó a cabo con inosina y xantosina, a pH 5. Los resultados son la media de al menos 3 réplicas biológicas. C: control, MJ: metil jasmonato. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control de acuerdo con la prueba t de Student $P \leq 0,01$ (**).

VI. DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS CITOSÓLICAS DE JUDÍA

El metabolismo de nucleótidos implica rutas de síntesis *de novo*, reciclaje y degradación, procesos que necesitan una estricta coordinación para el correcto desarrollo de la planta. De hecho, la desregulación de los genes implicados en estas rutas causa defectos en el desarrollo de las plantas como reducción en la tasa de germinación, plantas enanas, alteraciones de la fertilidad, letalidad del cigoto y alteraciones en la tasa fotosintética, entre otros (Witte y Herde, 2020).

Las nucleosidasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de los nucleósidos dando lugar a la base nitrogenada y al azúcar, se han postulado como enzimas clave en el control entre el reciclaje y la degradación de nucleótidos (Möhlmann et al., 2010). El análisis de las bases de datos de distintos genomas mostró que, en la mayoría de las especies de plantas, las nucleosidasas están codificadas por dos genes, aunque algunas de ellas como soja, arroz, trigo y maíz contienen tres o más copias. El caso de maíz y arroz podría explicarse ya que el ancestro desde el que evolucionaron sufrió una duplicación completa del genoma (Gaut y Doebley, 1997; Yu et al., 2005), mientras que el genoma de soja y trigo ha sufrido una duplicación más reciente (Schmutz et al., 2010; Brechley et al., 2012). El genoma de *P. vulgaris* codifica dos nucleosidasas citosólicas, PvNSH1 y PvNSH2, que comparten el 53 % de similitud en su secuencia, que es menor que la que presentan con sus ortólogos en otras plantas. Esto sugiere que estos dos genes parálogos se diferenciaron pronto en su evolución. Tanto PvNSH1 como PvNSH2 conservan el dominio rico en aspartato DXDXXXDD presente en todas las nucleosidasas caracterizadas hasta el momento (DTPGIDD en plantas; Versees y Steyaert, 2003), y todos los residuos identificados como importantes para la actividad nucleosidasa. Entre dichos residuos destacan los tres Asp y la Leu que se coordinan con el cofactor de Ca^{2+} , los residuos que se unen a la ribosa y los aminoácidos que rodean a la nucleobase (Figura 7). De todos estos residuos conservados, solo hay dos que difieren entre PvNSH1 y PvNSH2. El Trp-245 y el Asp-250 de PvNSH1 están sustituidos por Tyr-234 y Tyr-239 en PvNSH2. Estos dos residuos tienen un papel esencial en la determinación de la especificidad del sustrato (Kopečna et al., 2013). El análisis filogenético muestra que las nucleosidasas de judía se agrupan en dos clados diferentes (Figura 7B), lo que confirma la relación entre los clados y las propiedades enzimáticas propuestas por Kopečna y col. (2013). Dentro del Clado I se encuentran las NSHs de la Subclase Ia, que incluye a las nucleosidasas con preferencia por inosina y xantosina y que contienen Tyr-250 y Tyr-245. En el Clado II se encuentran

mayoritariamente las NSHs de la Subclase II, que presentan Asp-250 y Trp-245, y que tienen preferencia por uridina y xantosina. Esta clasificación concuerda tanto con la especificidad de sustrato obtenida experimentalmente en judía, que muestra que PvNSH1 presenta mayor actividad con uridina que PvNSH2, como con los observados en otras nucleosidasas recombinantes de plantas previamente descritas (Jung et al., 2009, 2011; Kopečna et al., 2013).

El análisis *in silico* de la región promotora (-1.000 pb) de PvNSH1 y PvNSH2 identificó múltiples motivos relacionados con la regulación por giberelinas y ácido abscísico, así como con la nodulación. Giberelinas y ácido abscísico son las dos principales hormonas que regulan la germinación (Rodríguez-Gacio et al., 2009), lo que sugiere que PvNSH1 y 2 pueden desempeñar un papel relevante en esta fase del desarrollo. De hecho, el estudio de la regulación durante la germinación y desarrollo posgerminativo muestra que ambos genes y sus actividades enzimáticas se inducen durante la germinación (Figura 26 y 27). Asimismo, ambas nucleosidasas presentan un alto nivel de expresión y actividad en los nódulos (Figura 30).

Las proteínas recombinantes PvNSH1 y PvNSH2 pueden hidrolizar tanto nucleósidos de purina como pirimidina, pero no pueden hidrolizar todos los nucleósidos (Tablas 3 y 4). PvNSH1 muestra mayor actividad específica con uridina, seguido de xantosina y en menor grado por inosina (Tabla 3). Esto concuerda con la especificidad de sustrato mostrada por otras nucleosidasas incluidas en la subclase II, como NSH1 de *Arabidopsis*, ZMNRH2a y b de maíz, y PpNSH2 de *Physcomitrella patens* (Jung et al., 2009, 2011; Kopečna et al., 2013; Baccolini y Witte, 2019). La constante catalítica (K_{cat}/K_m) de PvNSH1 para los tres nucleósidos es del mismo orden de magnitud, lo que sugiere que la enzima tiene una preferencia similar para todos los sustratos. Por el contrario, PvNSH2 presenta mayor actividad con xantosina y menor con inosina y uridina, y su constante catalítica es de un orden de magnitud mayor para la xantosina que para la inosina, lo que indica que esta enzima tiene una clara preferencia por la xantosina como sustrato. Cuando la comparamos con PvNSH1, la constante catalítica de PvNSH2 para la xantosina es más de tres veces mayor que la de PvNSH1, y su K_m cinco veces menor aproximadamente. Además, ambas nucleosidasas de judía tienen actividad residual con guanósina y no presentan actividad con citidina o timidina, lo que confirma los estudios previos que indican que guanósina y citidina necesitan una desaminación hasta xantosina y uracilo, respectivamente, antes de ser hidrolizados (Moffatt et al., 2002; Stasolla et al., 2003;

Dahncke y Witte, 2013). De hecho, estudios recientes muestran que la guanosina no solo no puede ser hidrolizada por estas nucleosidasas, sino que inhibe su actividad (Voß et al., 2022). La transformación de timidina a timina se ha detectado en estudios con ^{14}C -timidina (Katahira y Ashihara, 2002), pero hasta ahora no se ha determinado como actividad hidrolasa in vitro.

Cuando *PvNSH2* se sobreexpresó en *E. coli*, la mayor parte de la proteína precipitó con la fracción insoluble (Figura 11), y no fue posible determinar actividad nucleosidasa con la pequeña cantidad que se obtuvo en la fracción soluble. La formación de cuerpos de inclusión tras la sobreexpresión en *E. coli* se había descrito previamente en NSH2 de *Arabidopsis* (Riegler et al., 2011), en la que tampoco pudo determinarse actividad en la fracción soluble (Jung et al., 2011; Riegler et al., 2011). Sin embargo, la sobreexpresión en *N. benthamiana* permitió la purificación de AtNSH2 en forma soluble (Baccolini y Witte, 2019) pero, al contrario de lo observado en PvNSH2, la enzima de *Arabidopsis* no presentó actividad hidrolítica con ninguno de los sustratos ensayados. Sin embargo, AtNSH2 puede formar un heterodímero con AtNSH1, el cual presenta una actividad por la xantosina 25 veces superior a la de AtNSH1 sola, y unas 3 veces inferior por la uridina, por lo que estos autores proponen que esta capacidad de heterodimerizar podría ser un mecanismo de regulación de la actividad nucleosidasa. Los análisis por LC-MS/MS de la fracción soluble que contenían a la proteína purificada PvNSH2 no mostraron evidencias de una posible coelución con NSH1 de *N. benthamiana* (Tabla 5). Además, fuimos incapaces de detectar una interacción de PvNSH1 y PvNSH2 mediante la copurificación con extractos que sobreexpresaban cada una de las proteínas (Figura 13). De forma conjunta, nuestros resultados sugieren que la posibilidad de que PvNSH2 interactúe con NSH1 de *N. benthamiana* para formar un heterodímero y copurificar juntas es muy pequeña, y que PvNSH2 no necesitaría interactuar con PvNSH1 para ser activa. Curiosamente, al igual que ocurre con PvNSH2, la nucleosidasa PpNSH1 del musgo *P. patens* tiene mayor actividad por xantosina y menor con uridina, y forma homodímeros (Kopečna et al., 2013). Recientemente, Voß y col. (2022) han sobreexpresado PvNSH1 y PvNSH2 fusionadas traduccionalmente a HASTrepII en la posición N-terminal, que es una región menos conservada que la C-terminal en estas proteínas. En estas condiciones, PvNSH2 no presentó actividad con ninguno de los sustratos ensayados, pero, al igual que ocurría con AtNSH2, formó un heterodímero con PvNSH1 con una actividad por la xantosina 12 veces superior a PvNSH1. Por tanto, podría ser que en nuestra fusión

traduccional, la presencia de HASTrepII en el extremo C-terminal de PvNSH2 esté impidiendo el plegamiento correcto de esta, permitiendo que la enzima esté activa sin necesidad de formar un heterodímero con PvNSH1 y alterando su actividad catalítica.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NUCEOSIDASAS APOPLÁSTICAS DE JUDÍA

Además de las nucleosidasas citosólicas, se ha descrito la existencia de nucleosidasas apoplásticas. Así, en el espacio apoplástico de tubérculos de patata, se ha descrito una actividad nucleosidasa que presenta actividad con adenosina, pero no con inosina (Riewe et al., 2008), y se ha propuesto que podría estar asociada al reciclaje de eATP. Por otro lado, en *Arabidopsis* se ha identificado un gen (*AtNSH3*) que codifica una nucleosidasa de 891 aminoácidos, y que presenta una estructura en tándem con dos posibles dominios nucleosidasa (DXDXXXDD y DXDXXXGD) (Jung et al., 2011). *AtNSH3* se ha detectado en el espacio apoplástico en dos estudios proteómicos independientes (Borderies et al., 2003; Kwon et al., 2005). El análisis de las bases de datos del genoma de judía ha permitido identificar dos nucleosidasas con una alta similitud con *AtNSH3*. Ambas, PvSNH3 y PvNSH4, conservan los dos dominios nucleosidasa y comparten el 79 % de similitud en su secuencia, y entre un 60 y un 90 % con la mayoría de secuencias de otras plantas. Estos dos dominios nucleosidasa se conservan en casi todas las especies analizadas excepto en *Selaginella moellendorffii*, un licófito muy primitivo, que presenta una Leu en lugar de Asp en el primer dominio, y *Physcomitrella patens* que no presenta el segundo dominio. La búsqueda de secuencias de posibles nucleosidasas apoplásticas reveló que dichas nucleosidasas parecen no estar presentes en bacterias, cianobacterias, hongos, protozoos ni animales. El análisis filogenético sugiere que las nucleosidasas apoplásticas podrían haber surgido mucho más tarde en la evolución que las citosólicas, una vez que surgieron las plantas vasculares o traqueofitas, ya que no se han encontrado secuencias que codifiquen posibles nucleosidasas apoplásticas en taxones más primitivos, y sí aparecen una vez que divergen las plantas vasculares. Así, se han identificado NSHs de este tipo tanto en licófitas, las plantas vasculares más antiguas (Ej. *S. moellendorffii*), como en eufilofitas (resto de plantas vasculares) (Figura 16). Sin embargo, no se han identificado en algunos grupos de eufilofitas como las monilofitas (helechos y equisetos), ni en el grupo de las gimnospermas dentro de las espermatofitas. El que se encuentren en licofitas pero no en algunos grupos de eufilofitas, podría sugerir que estas nucleosidasas aparecieron antes de que estos grupos divergiesen y que, por alguna razón, han

desaparecido en las monilofitas y angiospermas, cuando estas divergieron de las espermatofitas y de las angiospermas, respectivamente. También cabría la posibilidad de que las nucleosidasas apoplásticas en licofitas y eufilofitas no tuviesen un origen común y que hubiesen surgido en eventos evolutivos independientes. Un evento similar ocurrió y dio lugar a la aparición de la enzima responsable de la síntesis de almidón a partir de glucógeno (Ball et al., 2015). Cabe destacar que, dentro de las dicotiledóneas, las posibles nucleosidasas apoplásticas de leguminosas, incluyendo a PvNSH4 y PvNSH3, están más próximas entre ellas que a las nucleosidasas de otras especies no leguminosas. Esto contrasta con lo observado en las nucleosidasas citosólicas, en las que PvNSH1 y PvNSH2 se agrupan en clados diferentes, junto a enzimas del mismo tipo de otras plantas. Esto también sugiere que la duplicación que posiblemente originó a PvNSH3 y PvNSH4 ha sido un evento relativamente reciente.

La proteína recombinante PvNSH4-HAStrep presentó mayor afinidad por inosina, aunque también hidrolizó xantosina con menor afinidad, mientras que la actividad con adenosina fue muy baja (4 % de la de inosina) (Tabla 9). Esto concuerda con lo descrito en el fluido apoplástico de hojas de *Arabidopsis*, en el que la mayor actividad nucleosidasa se obtuvo con inosina, mientras que la actividad catalítica con adenosina fue diez veces inferior (Jung et al., 2011). Según estos autores, la actividad apoplástica de *Arabidopsis* se debe fundamentalmente a AtNSH3, ya que mutantes de pérdida de función de *AtNSH3* no hidrolizan dichos nucleósidos. Por otro lado, estos resultados difieren de los obtenidos en tubérculos de patata, en los que la actividad nucleosidasa apoplástica sólo hidrolizó adenosina (Riewe et al., 2008). Una búsqueda en la base de datos *Phytozome* ha permitido identificar al menos tres secuencias de posibles nucleosidasas apoplásticas en patata (Soltu.DM.01G023360.2, Soltu.DM.01G023410.1 y Soltu.DM.01G023430.1) por lo que cabe la posibilidad de que dichas enzimas tengan afinidades diferentes por cada uno de los nucleósidos.

La sobreexpresión de PvNSH3 en *N. benthamiana* permitió su purificación por cromatografía de afinidad. Sin embargo, la enzima careció de actividad tanto con inosina como con xantosina a pH 5. La baja reproducibilidad de la sobreexpresión y la limitada cantidad de proteína purificada impidió ensayar la actividad con otros nucleósidos y en otro rango de pH, por lo que no se puede concluir si PvNSH3 presenta actividad nucleosidasa o no. Como se ha comentado anteriormente, en *Arabidopsis thaliana* se ha descrito una única nucleosidasa apoplástica, AtNSH3, que parece ser la responsable de la

mayor parte de la actividad nucleosidasa apoplástica degradadora de inosina y adenosina (Jung et al., 2011). Sin embargo, el análisis de su genoma ha permitido deducir que AtNSH4 y AtNSH5, inicialmente identificadas como posibles nucleosidasas truncadas, parecen formar parte de una única nucleosidasa con alta similitud a AtNSH3 (81 %), y que también presenta elevada similitud con PvNSH3 (62,7 %) y con PvNSH4 (63,9 %). Por tanto, cabe la posibilidad de que la nueva nucleosidasa apoplástica de *Arabidopsis* y PvNSH3 sean ortólogos y sean activas con algún sustrato o en alguna condición no ensayada. Otra posibilidad que explique la ausencia de actividad de PvNSH3 es que, al igual que ocurre con las nucleosidasas citosólicas NSH1 y NSH2 (Baccolini y Witte, 2019; Voß et al., 2022), esta necesite interactuar con PvNSH4 para formar un heterodímero con características distintas a PvNSH4.

Por otro lado, los ensayos para la determinación del pH óptimo de PvNSH4 mostraron mayor actividad a valores de pH cercanos a 5 (Figura 20), lo que también coincide con lo determinado para AtNSH3 de *Arabidopsis* y con la actividad apoplástica de patata. Estos resultados concuerdan con una posible localización apoplástica, ya que en diversos estudios realizados en raíces y hojas se han establecido valores de pH apoplástico de entre 4,5 y 6 (Bibikova et al., 1998; O'Leary et al., 2016). El análisis cinético de PvNSH4 permitió calcular una K_m para la inosina de 54 μM (Tabla 10), que se encuentra en el mismo orden de magnitud que la determinada en fluido apoplástico de hojas de *Arabidopsis* (97,2 μM).

3. REGULACIÓN DE LAS NUCLEOSIDASAS DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO POSGERMINATIVO TEMPRANO

La germinación de la semilla es un estado fisiológico que se caracteriza por marcadas fluctuaciones en el reservorio de nucleótidos (Möhlmann et al., 2010), cuya disponibilidad en los primeros estadios de desarrollo de la semilla es crítica para el proceso de germinación (Stasolla et al., 2003). El metabolismo de nucleótidos durante la germinación se ha estudiado mayoritariamente utilizando metabolitos marcados radiactivamente o en ensayos enzimáticos con extractos crudos (Ashihara, 1977; Guranowski y Pawelkiewicz, 1978; Gjuaranowski, 1979; Ashihara, 1983; Florchinger et al., 2006). Sin embargo, el número de estudios a nivel molecular es escaso y restringido mayoritariamente a la planta modelo *A. thaliana* (Jung et al., 2009, 2011; Cornelius et al., 2011). A pesar de la importancia del catabolismo de purinas en las leguminosas ureídicas,

este es el primer estudio que muestra un análisis completo de la regulación de las nucleosidasas durante la germinación y el desarrollo posgerminativo temprano en leguminosas. Nuestro análisis mediante qRT-PCR y los ensayos de actividad e inmunodetección revelan una marcada inducción de la expresión y actividad de NSHs durante la emergencia radicular, tanto en cotiledones como en ejes en desarrollo (Figura 26 y 27), lo que indica el importante papel de las nucleosidasas durante la germinación y desarrollo posgerminativo temprano. Estos resultados apoyan las observaciones previas obtenidas mediante la utilización de nucleótidos de purina y pirimidina marcados radioactivamente. De este modo, en cotiledones de la leguminosa ureídica *Phaseolus mungo*, la mayor parte de los derivados de purina se reciclan para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos en las fases de imbibición y al inicio de la germinación, mientras que la degradación prevalece en los estadios finales (Ashihara, 1983). De acuerdo con esto, en cotiledones de plantas del género *Lupinus*, se observó un incremento de actividad nucleosidasa con adenosina en el día 3 de germinación, coincidiendo con la reducción de las actividades de reciclado de las enzimas adenina e hipoxantina-guanosina fosforibosiltransferasa y adenosina kinasa (Guranowski y Pawelkiewicz, 1978; Guranowski y Barankiewicz, 1979), lo que sugiere que la inducción de las nucleosidasas marca la transición entre el reciclaje y la degradación de purinas. Asimismo, en ejes embrionarios se detectó una alta tasa de reciclaje durante los primeros estadios de la germinación, mientras que la degradación y la incorporación de nucleótidos de purinas marcados con ^{14}C hacia ureidos fue predominante en las fases más tardías. Nosotros hemos observado un incremento en la concentración de ureidos en ejes embrionarios al tercer DDI, coincidiendo con el incremento de la actividad nucleosidasa tanto en cotiledones como en radículas, lo que estaría en consonancia con dichos resultados. Por otro lado, varios estudios muestran que el reservorio de nucleótidos de pirimidina procede principalmente de las reacciones de reciclaje en las primeras fases de germinación y es reemplazado por la síntesis *de novo* en las fases tardías (Ross y Murray, 1971; Ashihara, 1977; Stasolla et al., 2001), produciéndose degradación de nucleótidos y nucleósidos a lo largo de todo el proceso germinativo. Además, en mutantes de pérdida de función de NSH1 de *Arabidopsis* y mutantes que sobreexpresan NSH1, se ha visto que las nucleosidasas juegan un papel fundamental en la regulación del balance entre la degradación y el reciclaje de uridina, lo que, según Jung y col. (2009), resalta la importancia de una regulación precisa de la actividad nucleosidasa para que la germinación se lleve a cabo con éxito.

En resumen, se ha demostrado que los genes de las dos nucleosidasas citosólicas de judía se expresan durante la germinación y el desarrollo posgerminativo y que su expresión se induce durante el desarrollo posgerminativo (Figura 26). Además, no se han detectado diferencias significativas entre la expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2* durante estas etapas, y no se ha podido distinguir entre ambas enzimas en nuestros análisis por inmunodetección (Figura 26). Sin embargo, cuando se utilizaron los extractos crudos para ensayar la actividad nucleosidasa con uridina como sustrato, se observó una reducción significativa de la actividad en comparación con la obtenida con xantosina, lo que sugiere un papel predominante de *PvNSH2* durante esta fase de desarrollo y resalta la importancia del catabolismo de purinas durante la germinación en judía.

Una vez la semilla ha germinado, la actividad nucleosidasa parece tener mayor importancia en radículas que en el hipocótilo, lo que concuerda con los resultados anteriormente obtenidos en *Arabidopsis* (Riegler et al., 2011). Esta mayor actividad nucleosidasa en la raíz podría estar relacionada con la capacidad de reciclar nucleósidos procedentes de la rizosfera (Tokuhisa et al., 2010). En los cotiledones de judía, se produce una alta movilización de compuestos sobre el día 7 de desarrollo (Lescano et al., 2016), lo que justifica la elevada actividad nucleosidasa en cotiledones senescentes (8 y 10 DDI). La diferencia entre el nivel de transcrito, la actividad y la proteína observada podría explicarse por la reducción de la cantidad total de proteína en los cotiledones senescentes como consecuencia de la movilización de estas, que podría afectar a la concentración relativa de NSHs.

La inducción de la actividad nucleosidasa y los niveles relativos entre radículas y cotiledones coinciden con la actividad nucleasa total determinada in vitro (Figura 28). En las fases finales de la germinación, la demanda de nucleótidos y la síntesis de ácidos nucleicos disminuye en cotiledones, ya que aumenta su degradación y transporte hacia los órganos en desarrollo (Ashihara, 1983). En semillas de ricino también se ha observado la degradación de ácidos nucleicos y nucleótidos, y el transporte de nucleósidos y nucleobases desde el endospermo senescente hacia los órganos en desarrollo (Kombrink y Beevers, 1983). Esto coincide con la inducción de la actividad ssADNsa y NSHs total observada en cotiledones de judía, y con estudios previos que muestran la inducción de las nucleasas S1/P1 en cotiledones senescentes (Lambert et al., 2016). No está claro si los nucleótidos degradados en los cotiledones se transportan a los tejidos en desarrollo como nucleósidos, nucleobases y/o ureidos. Los precursores de los ureidos, xantosina y xantina

no pueden ser reciclados (Ashihara et al., 2020a), y se ha descrito la disminución del reservorio de dichos compuestos en cotiledones justo después de la emergencia radicular (Tabla 11), lo que sugiere que en las fases tempranas de la germinación se sintetizan ureidos en los cotiledones. Además, se ha observado síntesis de ureidos en los primeros y últimos estadios de la germinación en cotiledones de *P. mungo*, así como la incapacidad para completar la degradación de ureidos en los cotiledones de judía (Ashihara, 1983; Quiles et al., 2009), lo que apoya que estas moléculas deberían transportarse hasta los ejes para su degradación. Por el contrario, semillas de *P. mungo* incubadas con adenina radiactiva en presencia de alopurinol, un inhibidor de la xantina deshidrogenasa, incorporaron radiactividad a la xantina en los ejes embrionarios (Ashihara, 1983; Quiles et al., 2009) y los ureidos disminuyeron cuando los ejes se incubaron con alopurinol (Ashihara, 1983; Quiles et al., 2009), lo que indica que, al menos una fracción de las purinas se cataboliza en los cotiledones y son translocadas hacia los ejes en forma de nucleobases y degradadas a ureidos en el interior de estos.

En los ejes embrionarios de judía se produce un fuerte incremento en la actividad ssADNasa durante la emergencia radicular en paralelo con el incremento de la actividad nucleosidasa, de los niveles de ureidos y de los de algunos nucleósidos. Una nucleasa S1/P1 con un posible papel en el desarrollo y dos nucleotidasas también se inducen después de la emergencia radicular (Lambert et al., 2014; Cabello-Díaz et al., 2015; Galvez-Valdivieso et al., 2020). Además, la expresión coordinada de nucleasas, nucleotidasas y nucleosidasas en ejes en desarrollo sugiere que la acumulación de ácidos nucleicos durante la formación de la semilla podría servir como una reserva potencial de nitrógeno y fósforo. Esto podría ser particularmente relevante para especies con genomas largos o con gran cantidad de ADN en la semilla como resultado de la endoreplicación. Curiosamente, los cotiledones y ejes embrionarios de *P. vulgaris* contienen un núcleo endopoliploide (Rewers y Sliwinska, 2014).

En resumen, la expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2* y la actividad nucleosidasa aumenta alrededor de la emergencia radicular, sin diferencias significativas en los niveles de expresión de ambos genes, lo que indica que ambas nucleosidasas juegan un papel fundamental en la movilización de nucleótidos durante la germinación y el desarrollo posgerminativo temprano. En la Figura 37 se muestra un esquema representativo del posible papel de *PvNSH1* y *PvNSH2* en este proceso. De acuerdo con esto, *PvNSH1* podría tener un papel predominante en el catabolismo de pirimidinas, mientras que

PvSNH2, o el heterodímero PvNSH1/PvNSH2 podría estar más relacionada con el catabolismo de purinas, al que también contribuye PvNSH1. Este papel predominante de PvNSH2 (o el heterodímero PvNSH1/PvNSH2) en el catabolismo de purinas durante el desarrollo de la semilla en judía podría estar relacionado con la importancia del catabolismo de purinas en las leguminosas ureídicas.

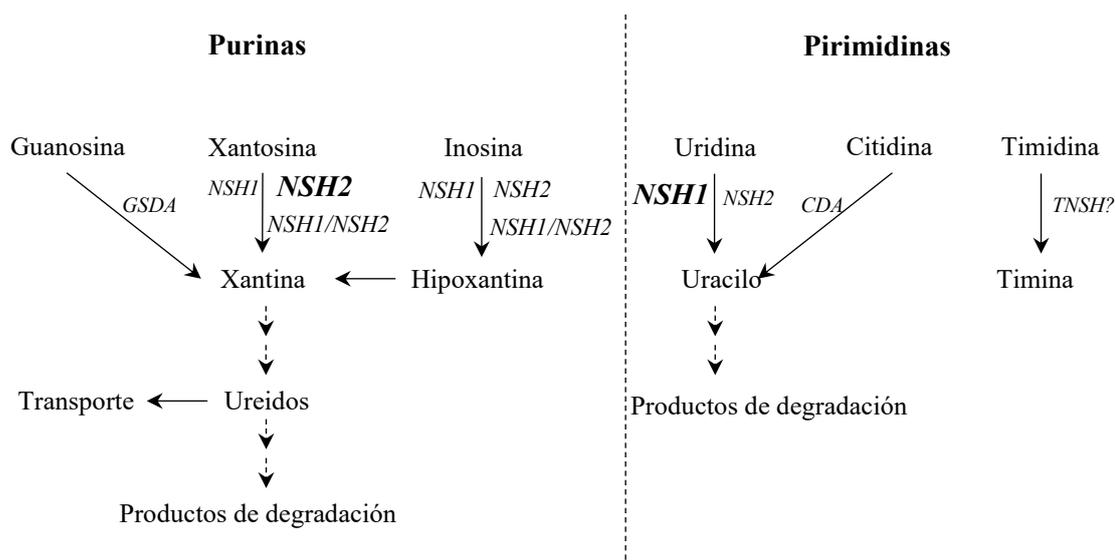


Figura 37. Modelo hipotético de la degradación de purinas y pirimidinas durante la germinación de judía que resalta el papel de PvNSH1 y PvNSH2. Las nucleosidasas se inducen tras la emergencia radicular. El tamaño e intensidad de las letras indican un papel mayoritario de esta isoforma. GSDA: guanosina deaminasa; CDA: citidina deaminasa; NSH1: PvNSH1; NSH2: PvNSH2; NSH1/NSH2: heterodímero PvNSH1/PvNSH2; TNSH: posible timina deaminasa.

4. PAPEL DE LAS NUCLEOSIDASAS DURANTE LA SÍNTESIS DE UREIDOS EN PLANTAS DE JUDÍA CULTIVADAS EN CONDICIONES DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

El análisis de la regulación de las nucleosidasas en tejidos de plantas adultas sugiere un papel relevante de las nucleosidasas citosólicas PvNSH1 y PvNSH2 en nódulos de plantas dependientes de la fijación biológica de nitrógeno y en raíces tanto de estas como de plantas fertilizadas con nitrato (Figura 30). El papel de las nucleosidasas en raíces podría estar relacionado con la asimilación de nucleótidos y/o sus derivados procedentes del suelo. Se ha descrito la presencia de cantidades considerables de nucleótidos de purina y pirimidina en el suelo (Phillips et al., 1997; Jenkins et al., 2017), y que estos pueden ser incorporados a la planta a través de sus raíces (Girke et al., 2014).

Los nódulos son las estructuras en las que se produce la síntesis *de novo* de ureidos. Puesto que las nucleosidasas intervienen en la hidrólisis de xantosina dando lugar a xantina, el sustrato de partida de la ruta de síntesis de ureidos, los niveles elevados de *PvNSH1* y *PvNSH2* en nódulos refuerza la idea de su participación en esta ruta metabólica. El bloqueo de la expresión de *PvNSH1* con dos construcciones antisentido distintas, una del extremo 3' (ARNi-sil1) y otra de una región central y con mayor similitud con *PvNSH2* (ARNi-sil12) mostraron distinto nivel de reducción de la expresión de ambos genes, de modo que las raíces silenciadas con ARNi-sil12 mostraron mayor reducción de la expresión de *PvNSH1* que las de las silenciadas con ARNi-sil1. Un efecto similar parece observarse sobre la expresión de *PvNSH2*, aunque en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas, posiblemente por la mayor variabilidad obtenida. Esta diferencia de comportamiento entre ambos ARNi podría deberse a que el silenciamiento con el ARNi-sil12 sea más eficiente que el del ARNi-sil1, o a que, al estar diseñado frente a una región más conservada en *PvNSH1* y *PvNSH2*, esté bloqueando la expresión de ambos genes o que lo esté haciendo en mayor grado que el ARNi-sil1. Por otro lado, y puesto que parece que la activación de *PvNSH2* requiere de su interacción con *PvNSH1* (Voß et al., 2022), el bloqueo de *PvNSH1* podría estar afectando a la actividad de ambas enzimas.

El análisis de actividad nucleosidasa en raíces y nódulos también mostro una reducción de esta y más acusada con el ARNi-sil12. Sin embargo, esto no tuvo ningún efecto en la acumulación de ureidos en ninguno de estos dos tejidos. Estos resultados difieren de los recientemente publicados por Voß y col. (2022), que mostraron que nódulos de judía con la expresión de *PvNSH1* bloqueada mediante CRISPR acumulan xantosina y presentan niveles muy reducidos de alantoato. Sin embargo, el bloqueo de *PvNSH2* no afectó a los niveles de xantosina y ureidos, lo que sugiere que solo *PvNSH1* es una enzima crítica para la biosíntesis de ureidos (Voß et al., 2022). Esto parece entrar en contradicción con los altos niveles de expresión de *PvNSH2* detectados en nódulos (Figura 30), y con que el heterodímero *PvNSH1/PvNSH2* presente mucha mayor actividad con xantosina que *NSH1* sola (Voß et al., 2022). No obstante, como indican estos autores, estos resultados y los obtenidos en *Arabidopsis* (Baccolini y Witte, 2019) sugieren que *NSH1* parece ser suficiente para prevenir la acumulación de xantosina. Sin embargo, plantas con *NSH1* no funcional, pero con capacidad de formar un heterodímero funcional con *NSH2* no

acumulan xantosina, lo que sugiere que ambas enzimas participan en la degradación de xantosina (Baccolini y Witte, 2019).

Las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos por Voß y col. (2022) pueden deberse a la metodología utilizada para reducir la expresión de las nucleosidasas. El silenciamiento mediante ARNi utilizado en este trabajo provoca una reducción parcial de la expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2*, mientras que el bloqueo por CRISPR utilizado por Voß y col. (2022) se ha mostrado como una técnica más efectiva. También podría ocurrir que, en nuestro caso, el descenso de actividad nucleosidasa como consecuencia del descenso de la expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2* no sea suficiente como para causar un efecto en los niveles de ureidos. El bloqueo mediante silenciamiento de *PRAT3*, un gen que codifica una enzima clave en la síntesis *de novo* de ureidos en los nódulos (Coletto et al., 2016), causó una reducción de su expresión del 50 % en las raíces transformadas, lo que provocó una caída de aproximadamente de un 94 % de su actividad. Sin embargo, a pesar de la gran reducción de la actividad PRAT, la acumulación de ureidos en sus raíces solo se redujo un 40 % (Coletto et al., 2016). En nuestro caso, la mayor reducción de actividad nucleosidasa en raíz fue de un 70 %, lo que podría no ser suficiente para afectar al contenido de ureidos, aunque no hay que descartar otras causas.

5. PAPEL DE LAS NUCLEOSIDASAS APOPLÁSTICAS EN LA RESPUESTA A DISTINTOS TIPOS DE ESTRESSES EN JUDÍA

El análisis *in silico* de la región promotora de *PvNSH3* y *PvNSH4* identificó múltiples motivos relacionados con la respuesta a distintos tipos de estreses tanto bióticos como abiótico. Tratamientos de plántula de judía con distintos tipos de hormonas relacionadas con la respuesta a estrés y otras situaciones inductoras de estrés (altas y bajas temperaturas), mostraron que la expresión de *PvNSH4* se indujo en radículas en respuesta a MJ, mientras que no se alteró significativamente con ninguno de los demás tratamientos (Figura 34). Esto concuerda con lo observado en *Arabidopsis*, en la que la expresión de *AtNSH3* se indujo en cultivos líquidos de plántulas en respuesta a ácido jasmónico y tras herida (Jung et al., 2011). Por otro lado, el bloqueo simultáneo de la hidrólisis de nucleósidos en el espacio apoplástico y de su transporte al interior de la célula provocó acumulación de adenosina y uridina en el apoplasto, reducción en la eficiencia de fotosistema II y una mayor susceptibilidad a la infección por *Botrytis cinerae* (Daumann et al., 2013). Estos resultados sugieren un papel de las nucleosidasas apoplásticas en la

respuesta a estreses bióticos. De entre estos papeles, se ha sugerido que podrían participare en la regulación de los niveles de eATP. El eATP es una molécula señalizadora que puede liberarse activamente al exterior celular (Thomas et al., 2000; Kim et al., 2006; Rieder y Neuhaus, 2011), o pasivamente debido al daño celular (Song et al., 2006). Una vez en el exterior de la célula, el eATP interacciona con su receptor, lo que desencadena una cascada de señalización que induce cambios fisiológicos que protegen a la planta frente a estreses bióticos y abióticos, pero también garantiza que esta crezca y se desarrolle de manera adecuada (Lim et al., 2014). Para actuar como molécula señalizadora de manera eficiente, el eATP debe de poder ser retirado del apoplasto una vez ejerza su función, lo que ocurre por la acción concertada de apirasas y nucleotidasas (Steinebrunner et al., 2003; Wolf et al., 2007, Jung et al., 2011). La adenosina resultante puede reimportarse a la célula a través de transportadores de nucleósidos (Chen et al., 2006; Traub et al., 2007; Möhlmann et al., 2014) o hidrolizarse hasta adenina por acción de nucleosidasas (Riewe et al., 2008).

Por otro lado, se ha descrito la existencia de una interacción cruzada entre la señalización por las hormonas típicas de respuesta a este tipo de estreses (jasmonato, etileno y ácido salicílico) y el eATP en la respuesta a estreses bióticos (Tripathi et al., 2018; Jewell et al., 2019). Además, un análisis transcriptómico y metabolómico de la respuesta a la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveló un aumento de casi 5 veces en los niveles de *PvNSH4* en raíces de judía tras 24 h de infección, así como un incremento en la expresión de varios genes relacionados con la señalización por jasmonato y la relevancia de la movilización de nitrógeno en las raíces infectadas (Chen et al., 2019). Todo esto apoya la hipótesis de que las nucleosidasas apoplásticas podrían participar en la respuesta a estreses bióticos.

Además de los motivos relacionados con estrés, en las regiones promotoras de *PvNSH3* y *PvNSH4* se han identificado motivos relacionados con la nodulación. Existen varios estudios que relacionan los jasmonatos con la nodulación, si bien, estos muestran resultados contradictorios. Así, se ha sugerido que esta hormona es un regulador negativo de la nodulación en el sistema *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago truncatula*, de modo que inhibe la expresión de los genes tempranos de la nodulación (Sun et al., 2006), y que la aplicación de MJ inhibe la nodulación en *L. japonicus* (Nakagawa y Kawaguchi; 2006). Sin embargo, otros estudios muestran que los jasmonatos pueden inducir los genes *nod* en la nodulación de *Bradyrhizobium japonicum* en soja (Maboob et al., 2006), mientras

que Costanzo y col. (2012), sugirieron que los jasmonatos, junto con otras hormonas, juegan un papel relevante en la autorregulación de la nodulación. El que las regiones promotoras de *PvNSH3* y *PvNSH4* presenten motivos relacionados con la nodulación y con la respuesta a hormonas como el MJ plantea la posibilidad de que dichos genes desempeñen algún papel en los nódulos, bien en el establecimiento de la nodulación o en la senescencia. De hecho, la única situación en la que se ha detectado variación en la expresión de *PvNSH3* fue cuando se analizó su expresión en nódulos en distinto grado de madurez. Este análisis sugirió que los niveles de *PvNSH3* aumentan en nódulos senescentes, aunque dicho resultado debe de ser tomado con cautela, ya que los niveles de expresión fueron muy bajos y estuvieron fuera del límite de linealidad, de ahí que no se hayan incluido en este trabajo.

Se disponía de evidencias que sugerían que las enzimas con dos dominios nucleosidasas se localizan en el espacio apoplástico. Por un lado, se había detectado actividad nucleosidasa en el espacio apoplástico de hojas de *Arabidopsis* y ausencia de dicha actividad en mutantes de pérdida de función de AtNSH3 (Jung et al., 2011). Por otro lado, se había identificado AtNSH3 en la fracción extracelular en dos estudios proteómicos independientes (Borderies et al., 2003; Kwon et al., 2005). El análisis *in silico* de las secuencias de PvNSH3 y PvNSH4, el hecho de que PvNSH4 tenga un pH óptimo cercano a 5, la inducción de la actividad nucleosidasa en el fluido apoplástico de radículas de judía tras incubación con MJ, y la colocalización de las fusiones traduccionales de PvNSH3-eYFP y PvNSH4-eYFP con AT5G11420-mCherry, una proteína localizada en el apoplasto (Stoddard y Rolland, 2018) apoyan fuertemente que ambas proteínas se localizan en el espacio apoplástico. Resulta curioso que en ninguno de los dos estudios proteómicos mencionados se detecten en el espacio extracelular las nucleosidasas de *Arabidopsis* anotadas como AtNSH4 y AtNSH5. Sin embargo, ambos estudios están basados en la identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el espacio extracelular tras fraccionamiento en 2D-PAGE, por lo que cabe la posibilidad de que esta segunda nucleosidasa apoplástica de *Arabidopsis* no fuese identificada. Además, nuestros resultados sugieren que el ortólogo de esta nucleosidasa en judía, PvNSH3, se expresa en condiciones muy específicas, pues hemos sido incapaces de detectar niveles elevados de expresión ni variaciones en dichos niveles en ninguno de los tejidos ni condiciones estudiadas. Asimismo, la expresión de PvNSH3 como proteína recombinante (tanto

fusionada a HAStrepII como a mCherry) ha planteado serios problemas y, cuando ha sido exitosa, siempre se ha expresado en cantidades muy reducidas.

VII. CONCLUSIONES

Conclusiones

La presencia de todos los residuos esenciales en las secuencias PvNSH1 y PvNSH2 y la detección de actividad nucleosidasa en las proteínas recombinantes PvNSH1-His y PvNSH2-HAStrep permiten concluir que los genes *PvNSH1* y *PvNSH2* codifican nucleosidasas funcionales.

La caracterización cinética de las nucleosidasas citosólicas PvNSH1 y PvNSH2 indica que PvNSH1 tiene un espectro de acción más amplio que PvNSH2, y sugiere que PvNSH1 está implicada en la degradación tanto de nucleósidos de purinas como de pirimidinas, mientras que PvNSH2 parece tener un papel preferente en la degradación de nucleósidos de purina.

Los resultados obtenidos con las proteínas PvNSH1 y PvNSH2 recombinantes etiquetadas en el extremo carboxilo muestran que PvNSH2 no necesita interactuar con PvNSH1 para ser activa, aunque la posición de los *tags* podría estar afectando a dicha interacción.

La inducción de la expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2*, el aumento de la actividad nucleosidasa, y la acumulación de nucleosidasa durante la emergencia radicular, sugiere que ambas nucleosidasas juegan un papel relevante durante la germinación y el desarrollo posgerminativo de judía.

Construcciones antisentido frente a *PvNSH1* redujeron los niveles de expresión de *PvNSH1* y *PvNSH2* en raíces transformadas, así como la actividad nucleosidasa en dichas raíces y en nódulos procedentes de las mismas, pero no alteraron significativamente los niveles de ureidos, lo que sugiere que el grado de reducción de la actividad nucleosidasa no es suficiente como para afectar a los niveles de ureidos.

Las características de los péptidos señal predichos de PvNSH3 y PvNSH4 y su colocalización con la proteína AT5G11420 sugieren fuertemente que ambas proteínas se localizan en el espacio apoplástico.

El análisis filogenético de las posibles nucleosidasas apoplásticas identificadas en las bases de datos sugiere que estas tienen un origen evolutivo relativamente reciente.

El ensayo de actividad nucleosidasa con extractos crudos a pH 5 y utilizando inosina como sustrato detecta, principalmente, actividad apoplástica, por lo que dicho ensayo

puede utilizarse como una alternativa al ensayo con fluido apoplástico, lo que reduce su complejidad.

La inducción de la expresión de *PvNSH4* y de la actividad nucleosidasa en los fluidos apoplásticos en respuesta a metil jasmonato sugiere que *PvNSH4* podría estar implicada en la respuesta a estreses regulados por esta hormona.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alam, R., Barbarovich, A.T., Caravan, W., Ismail, M., Barskaya, A., Parkin, D.W., y Stockman, B.J. (2018). Druggability of the guanosine/adenosine/cytidine nucleoside hydrolase from *Trichomonas vaginalis*. *Chemical Biology and Drug Design* 92:1736–1742.
- Amiour N., Imbaud S., Clément G. (2012). The use of metabolomics integrated with transcriptomic and proteomic studies for identifying key steps involved in the control of nitrogen metabolism in crops such as maize. *Journal of Experimental Botany* 63: 5017–5033.
- Anderson, J.D. (1977). Responses of adenine nucleotides in germinating soybean embryonic axes to exogenously applied adenine and adenosine. *Plant Physiology*. 60: 689–692.
- Angioi, S. A., Rau, D., Attene, G., Nanni, L., Bellucci, E., Logozzo, G., Negri, V., Zeuli, P. L. S., y Papa, R. (2010). Beans in Europe: Origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics* 121(5), 829–843.
- Ariani, A., Berny Mier y Teran, J. C., y Gepts, P. (2016). Genome-wide identification of SNPs and copy number variation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using genotyping-by-sequencing (GBS). *Molecular Breeding*, 36:7.
- Ashihara, H. (1983). Changes in Activities of Purine Salvage and Ureide Synthesis during Germination of Black Gram (*Phaseolus mungo*) Seeds. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 113(1): 47–60.
- Ashihara, H., Stasolla, C., Fujimura, T., y Crozier, A. (2018). Purine salvage in plants. In *Phytochemistry* 47: 89–124.
- Ashihara, H. (1977). Changes in activities of the de novo and salvage pathways of pyrimidine nucleotide biosynthesis during germination of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 81(3): 199–211.
- Ashihara, H., Takasawa, Y., Ashihara, T. S., Takasawa, H., Suzuki, Y., y Takasawa, Y. (1997). Metabolic fate of guanosine in higher plants. *Physiologia Plantarum* 100: 909–916.

- Armenteros, J. J. A., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., Von Heijne, G., Elofsson, A., y Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Science Alliance*, 2: e201900429.
- Atkins CA. (1991). Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Elsevier Science, Amsterdam, the Netherlands (293–319).
- Baccolini, C., y Witte, C. P. (2019). AMP and GMP catabolism in arabidopsis converge on xanthosine, which is degraded by a nucleoside hydrolase heterocomplex. *Plant Cell*, 31: 734–751.
- Ball, S., Colleoni, C., y Arias, M. C. (2015). The transition from glycogen to starch metabolism in cyanobacteria and eukaryotes. In *Starch: Metabolism and Structure* (93–158). Springer Japan.
- Baral, B., Teixeira da Silva, J.A., Paudyal, R.S., Gupta, V.N., 2012. Biogenesis and cycling of ureides in broad bean (*Vicia faba* L.). *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology* 6: 88–97.
- Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G. L. A., D’Amore, R., Allen, A. M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Huo, N., Luo, M. C., Sehgal, S., Gill, B., Hall, N. (2012). Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491: 705-710.
- Bagh, K., Hiraoki, T., Thorpe, T. A., y Vogel, H. J. (2004). Nitrogen-15 NMR studies of nitrogen metabolism in *Picea glauca* buds. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 803–809.
- Baral, B., Teixeira da Silva, J. A., y Izaguirre-Mayoral, M. L. (2016). Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. *Journal of Plant Physiology* 193: 97–109.
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055–1066.
- Billington, R. A., Bruzzone, S., De Flora, A., Genazzani, A. A., Koch-Nolte, F., Ziegler, M., y Zocchi, E. (2006). Emerging functions of extracellular pyridine nucleotides. *Molecular Medicine* 12: 324–327.

- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., y Papa, R. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E788-96
- Bitocchi, E., Rau, D., Bellucci, E., Rodriguez, M., Murgia, M. L., Gioia, T., Santo, D., Nanni, L., Attene, G., y Papa, R. (2017). Beans (*Phaseolus* spp.) as a model for understanding crop evolution. *Frontiers in Plant Science* 8: 722.
- Bloom, A. J. (2015). The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. *Current Opinion in Plant Biology* 25: 10–16.
- Borderies, G., Jamet, E., Lafitte, C., Rossignol, M., Jauneau, A., Boduart, G., Monsarrat, B., Esquerré-Tugayé, M. T., Boudet, A., y Pont-Lezica, R. (2003). Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: A critical analysis. *Electrophoresis*, 24: 3421–3432.
- Bowne, J.B., Erwin, T.A., Juttner, J., Schnurbusch, T., Langridge, P., Bacic, A., Roessner, U. (2011). Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Molecular Plant* 5: 418–429.
- Broughton, W. J., y Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *The Biochemical Journal*, 125: 1075–1080.
- Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R., y Sagi, M. (2008). A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1* *Arabidopsis* mutant. *Plant Journal*, 54: 496–509.
- Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *Journal of Theoretical. Biology* 62: 491–503.
- Cabello-Díaz, J. M., Gálvez-Valdivieso, G., Caballo, C., Lambert, R., Quiles, F. A., Pineda, M., y Piedras, P. (2015). Identification and characterization of a gene encoding for a nucleotidase from *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 185: 44–51.
- Cabello-Díaz, J.M., Quiles, F.A., Lambert, R., Pineda, M., Piedras, P., (2012). Identification of a novel phosphatase with high affinity for nucleotidesmonophosphate from common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 54–60.

- Cao, Y., Tanaka, K., Nguyen, C. T., y Stacey, G. (2014). Extracellular ATP is a central signaling molecule in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 20: 82–87.
- Casartelli, A., Melino, V. J., Baumann, U., Riboni, M., Suchecki, R., Jayasinghe, N. S., Mendis, H., Watanabe, M., Erban, A., Zuther, E., Hoefgen, R., Roessner, U., Okamoto, M., y Heuer, S. (2019). Opposite fates of the purine metabolite allantoin under water and nitrogen limitations in bread wheat. *Plant Molecular Biology* 99: 477–497.
- Casartelli, A., Riewe, D., Hubberten, H. M., Altmann, T., Hoefgen, R., y Heuer, S. (2018). Exploring traditional aus-type rice for metabolites conferring drought tolerance. *Rice* 11: 9.
- Cassman, K. G., y Dobermann, A. (2022). Nitrogen and the future of agriculture: 20 years on. *Ambio* 51: 17–24.
- Chen, L., Wu, Q., He, T., Lan, J., Ding, L., Liu, T., Wu, Q., Pan, Y., y Chen, T. (2020). Transcriptomic and metabolomic changes triggered by fusarium solani in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genes*, 11: 117.
- Chen, X., Yao, Q., Gao, X., Jiang, C., Harberd, N. P., y Fu, X. (2016). Shoot-to-Root Mobile Transcription Factor HY5 Coordinates Plant Carbon and Nitrogen Acquisition. *Current Biology* 26: 640–646.
- Chungopast, S., Hirakawa, H., Sato, S., Handa, Y., Saito, K., Kawaguchi, M., Tajima, S., y Nomura, M. (2014). Transcriptomic profiles of nodule senescence in *Lotus japonicus* and *Mesorhizobium loti* symbiosis. *Plant Biotechnology* 31: 345–349.
- Coletto, I., Trenas, A. T., Erban, A., Kopka, J., Pineda, M., y Alamillo, J. M. (2016). Functional specialization of one copy of glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase in ureide production from symbiotically fixed nitrogen in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell and Environment*, 39: 1767–1779.
- Coletto I, Vega-Mas I, Glauser G, González-Moro M, Marino D, Ariz I. (2019). New insights on *Arabidopsis thaliana* root adaption to ammonium nutrition by the use of a quantitative proteomic approach. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 814.

- Coneva, V., Simopoulos, C., Casaretto, J. A., El-kereamy, A., Guevara, D. R., Cohn, J., Zhu, T., Guo, L., Alexander, D. C., Bi, Y. M., McNicholas, P. D., y Rothstein, S. J. (2014). Metabolic and co-expression network-based analyses associated with nitrate response in rice. *BMC Genomics* 15: 1056.
- Costanzo, M. E., Andrade, A., Del Carmen Tordable, M., Cassán, F., y Abdala, G. (2012). Production and function of jasmonates in nodulated roots of soybean plants inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Archives of Microbiology* 194: 837–845.
- Dahncke, K., y Witte, C. P. (2013). Plant purine nucleoside catabolism employs a guanosine deaminase required for the generation of xanthosine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 4101–4109.
- Daumann, M., Fischer, M., Niopek-Witz, S., Girke, C., y Möhlmann, T. (2015). Apoplastic nucleoside accumulation in *arabidopsis* leads to reduced photosynthetic performance and increased susceptibility against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science* 6: 1158.
- Degano, M. (2022). Structure, Oligomerization and Activity Modulation in N-Ribohydrolases. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 2576.
- Degenkolbe, T., Do, P.T., Kopka, J., Zuther, E., Hinch, D.K., Köhl, K.I. (2013). Identification of drought tolerance markers in a diverse population of rice cultivars by expression and metabolite profiling. *Plos One* 8: e63637.
- Delgado-García, E., Piedras, P., Gómez-Baena, G., García-Magdaleno, I. M., Pineda, M., Gálvez-Valdivieso, G. (2021). Nucleoside Metabolism Is Induced in Common Bean During Early Seedling Development. *Frontiers in Plant Science*, 12: 651015.
- Del Río, L.A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: An overview. *Journal of Experimental Botany* 66: 2827–2837.
- Díaz-Leal, J.L., Gálvez-Valdivieso, G., Fernández, J., Pineda, M., Alamillo, J.M. (2012). Developmental effects on ureide levels are mediated by tissuespecific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* 63: 4095–4106.

- Díaz-Leal, J.L., Torralbo, F., Antonio Quiles, F., Pineda, M., y Alamillo, J.M. (2014). Molecular and functional characterization of allantoate amidohydrolase from *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 152: 43–58.
- Dordas, C.A., y Sioulas, C. (2009). Dry matter and nitrogen accumulation, partitioning, and retranslocation in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) as affected by nitrogen fertilization. *Field Crops Research* 110, 35–43.
- Edel, K.H., Marchadier, E., Brownlee, C., Kudla, J., y Hetherington, A. M. (2017). The Evolution of Calcium-Based Signalling in Plants. *Current Biology* 27: R667–R679).
- Edgar R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792–1797.
- Estrada-Navarrete G., Alvarada-Affantranger, X., Olivares, J.E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murilla, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P.M y Sánchez F. *Technical advance* 19: 1385–1393.
- Figueroa-Villar, J.D., y Sales, E.M. (2017). The importance of nucleoside hydrolase enzyme (NH) in studies to treatment of Leishmania: A review. *Chemico-Biological Interactions* 263: 18–27.
- Finn, R.D., Clements, J., y Eddy, S.R. (2011). HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research* 39: W29–W37.
- Flörchinger, M., Zimmermann, M., Traub, M., Neuhaus, H.E., y Möhlmann, T. (2006). Adenosine stimulates anabolic metabolism in developing castor bean (*Ricinus communis* L.) cotyledons. *Planta*, 223: 340–348.
- Gaillard C, Moffatt BA, Blacker M, Laloue M (1998) Male sterility associated with APRT deficiency in *Arabidopsis thaliana* results from a mutation in the gene APT1. *Molecular and General Genetics* 257: 348–353.
- Galvez-Valdivieso, G., Delgado-Garcia, E., Diaz-Baena, M., Montaña, O., Quiles, F.A., Pineda, M., y Piedras, P. (2020). Biochemical and molecular characterization of PvNTD2, a nucleotidase highly expressed in nodules from *Phaseolus vulgaris*. *Plants* 9: 171.

- Gaut, B.S., y Doebley, J.F. (1997). DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 6809.
- Gehring, C., y Turek, I.S. (2017). Cyclic nucleotide monophosphates and their cyclases in plant signaling. *Frontiers in Plant Science* 8: 1704.
- Gepts, P., y Bliss, F.A. (1986). Phaseolin Variability among Wild and Cultivated Common Beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Economic Botany* 4: 469–478.
- Giabbai, B., y Degano, M. (2004). Crystal structure to 1.7 Å of the Escherichia coli pyrimidine nucleoside hydrolase yeiK, a novel candidate for cancer gene therapy. *Structure* 12: 739–749.
- Gioia, T., Logozzo, G., Marzario, S., Zeuli, P. S., y Gepts, P. (2019). Evolution of SSR diversity from wild types to U.S. Advanced cultivars in the Andean and Mesoamerican domestications of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plos One* 14: e0211342.
- Girke, C., Daumann, M., Niopek-Witz, S., y Möhlmann, T. (2014). Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Frontiers in Plant Science* 5: 443.
- Gómez-Baena, G., Armstrong, S.D., Halstead, J.O., Prescott, M., Roberts, S.A., McLean, L., Mudge, J.M., Hurst, J.L., y Beynon, R.J. (2019). Molecular complexity of the major urinary protein system of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Scientific reports* 9: 10757.
- Graham, P.H., y Vance, C.P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872–877.
- Guranowski, A., y Pawetkiewicz, J. (1978). Adenosylhomocysteinase and adenosine nucleosidase activities in *Lupinus luteus* cotyledons during seed formation and germination. *Planta* 139: 245–247.
- Guranowski, A., y Barankiewicz, J. (1979). Purine salvage in cotyledons of germinating lupin seeds. *FEBS Letters* 104: 95–98.
- Hammond, D.J., y Gutteridge, W.E. (1984). Purine and pyrimidine metabolism in the trypanosomatidae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 13: 243–261.

- Hanks J.F., Tolbert N.E., Schubert K.R. (1981). Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. *Plant Physiology* 68: 65–69.
- Harper, J.E, Gibson, A.H. (1984). Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. *Crop Science* 24: 797–801.
- Heinemann, K.J., Yang, S.Y., Straube, H., Medina-Escobar, N., Varbanova-Herde, M., Herde, M., Rhee, S., y Witte, C.P. (2021). Initiation of cytosolic plant purine nucleotide catabolism involves a monospecific xanthosine monophosphate phosphatase. *Nature communications*, 12, 6846.
- Higo, K., Ugawa, Y., y Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* 27: 297–300.
- Irani, S., Lobo, J.M., Gray, G.R., y Todd, C.D. (2018). Allantoin accumulation in response to increased growth irradiance in *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 62: 181–187.
- Isner, J.C., y Maathuis, F.J.M. (2018). CGMP signalling in plants: From enigma to main stream. *Functional Plant Biology* 45: 93–101.
- Jenkins, S., Swenson, T.L., Lau, R., Rocha, A.M., Aaring, A., Hazen, T.C., Chakraborty, R., Northen, T.R. (2017). Construction of viable soil defined media using quantitative metabolomics analysis of soil metabolites. *Frontiers in Microbiology* 8: 2618.
- Jewell, J.B., Sowders, J.M., He, R., Willis, M.A., Gang, D.R., y Tanaka, K. (2019). Extracellular ATP shapes a defense-related transcriptome both independently and along with other defense signaling pathways. *Plant Physiology* 179: 1144–1158.
- Jha, S.K., Sharma, M., y Pandey, G.K. (2016). Role of cyclic nucleotide gated channels in stress management in plants. *Current Genomics* 17: 315–329.
- Jung, B., Flörchinger, M., Kunz, H.H., Traub, M., Wartenberg, R., Jeblick, W., Neuhaus, H. E., y Möhlmann, T. (2009). Uridine-Ribohydrolase is a key regulator in the uridine degradation pathway of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 876–891.

- Jung, B., Hoffmann, C., y Möhlmann, T. (2011). Arabidopsis nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines. *Plant Journal* 65: 703–711.
- Kanani, H., Dutta, B., y Klapa, M. I. (2010). Individual vs. combinatorial effect of elevated CO₂ conditions and salinity stress on *Arabidopsis thaliana* liquid cultures: Comparing the early molecular response using time-series transcriptomic and metabolomic analyses. *BMC Systems Biology*, 4.
- Kaplan, B., Sherman, T., y Fromm, H. (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters*: 581: 2237–2246.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K.C., Gatzke, N., Sung, D. Y., y Guy, C. L. (2004). Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 4159–4168.
- Katahira, R., y Ashihara, H. (2002). Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta* 215: 821–828.
- Kim, J. H., Delauney, A.J., y Verma, D.P. (1995). Control of de novo purine biosynthesis genes in ureide-producing legumes: induction of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase gene and characterization of its cDNA from soybean and *Vigna*. *Plant Journal* 7: 77–86.
- Kim, S. Y., Sivaguru, M., y Stacey, G. (2006). Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiology*, 142: 984–992.
- Kombrink, E., y Beevers, H. (1983). Transport of purine and pyrimidine bases and nucleosides from endosperm to cotyledons in germinating castor bean seedlings. *Plant Physiology* 73: 370–376.
- Kopečná, M., Blaschke, H., Kopečný, D., Vigouroux, A., Končítíková, R., Novák, O., Kotland, O., Strnad, M., Moréra, S., y von Schwartzberg, K. (2013). Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides. *Plant Physiology* 163: 1568–1583.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547–1549.
- Kurtz, J. E., Exinger, F., Erbs, P., y Jund, R. (2002). The URH1 uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 41: 132–141.
- Kwak, M., y Gepts, P. (2009). Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 118: 979–992.
- Kwon, M., Fujioka, S., Jeon, J. H., Kim, H. B., Takatsuto, S., Yoshida, S., An, C. S., y Choe, S. (2005). A double mutant for the CYP85A 1 and CYP85A2 genes of *Arabidopsis* exhibits a brassinosteroid dwarf phenotype. *Journal of Plant Biology* 48: 237–244.
- Koncz, C., Schell, J. (1986). The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383–396.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lambert, R., Cabello-Díaz, J.M., Quiles, F.A., y Piedras, P. (2016). Identification of nucleases related to nutrient mobilization in senescing cotyledons from French bean. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 266.
- Lambert, R., Quiles, F.A., Cabello-Díaz, J.M., y Piedras, P. (2014). Purification and identification of a nuclease activity in embryo axes from French bean. *Plant Science*, 224: 137–143.
- Lambert, R., Quiles, F. A., Gálvez-Valdivieso, G., y Piedras, P. (2017). Nucleases activities during French bean leaf aging and dark-induced senescence. *Journal of Plant Physiology* 218: 235–242.
- Lamberto, I., Percudani, R., Gatti, R., Folli, C., and Petrucco, S. (2010). Conserved alternative splicing of *Arabidopsis* transthyretinlike determines protein localization and S-allantoin synthesis in peroxisomes. *Plant Cell* 22: 1564–1574.

- Lescano, C. I., Martini, C., González, C. A., y Desimone, M. (2016). Allantoin accumulation mediated by allantoinase downregulation and transport by Ureide Permease 5 confers salt stress tolerance to *Arabidopsis* plants. *Plant Molecular Biology*, 91: 581–595.
- Lescano, I., Devegili, A. M., Martini, C., Tessi, T. M., González, C. A., y Desimone, M. (2020). Ureide metabolism in *Arabidopsis thaliana* is modulated by C:N balance. *Journal of Plant Research* 133: 739–749.
- Letunic, I., y Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* 47: W256–W259.
- Lim, M.H., Wu, J., Yao, J., Gallardo, I.F., Dugger, J.W., Webb, L.J., Huang, J., Salmi, M. L., Song, J., Clark, G., y Roux, S.J. (2014). Apyrase suppression raises extracellular ATP levels and induces gene expression and cell wall changes characteristic of stress responses. *Plant Physiology*, 164: 2054–2067.
- Liu, X., Qian, W., Liu, X., Qin, H., y Wang, D. (2007). Molecular and functional analysis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 175: 448–461.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method 25: 402–408.
- Lodwig, E., y Poole, P. (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. In *Critical Reviews in Plant Sciences* 22: 37–78.
- Lothier, J., Gaufichon, L., Sormani, R., Lemaître, T., Azzopardi, M., Morin, H., Chardon, F., Reisdorf-Cren, M., Avice, J. C., y Masclaux-Daubresse, C. (2011). The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of Experimental Botany*, 62: 1375–1390.
- Mabood, F., Souleimanov, A., Khan, W., y Smith, D.L. (2006). Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 759–765.

- Mamidi, S., Rossi, M., Moghaddam, S. M., Annam, D., Lee, R., Papa, R., y McClean, P.E. (2013). Demographic factors shaped diversity in the two gene pools of wild common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Heredity* 110: 267–276.
- Mainguet, S.E., Gakière, B., Majira, A. (2009). Uracil salvage is necessary for early *Arabidopsis* development. *Plant Journal* 60: 280–291.
- Martinez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., y Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a Novel Species Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 417–426.
- McClean, P. E., y Lee, R. K. (2007). Genetic architecture of chalcone isomerase non-coding regions in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genome* 50: 203–214.
- McClean, P.E., Lee, R. K., Otto, C., Gepts, P., y Bassett, M.J. (2002). Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Heredity* 93: 148–152
- McLennan, A. G. (2000). Dinucleoside polyphosphates-friend or foe? *Pharmacology and Therapeutics* 87: 73–89.
- Moffatt, B., y Somerville, C. (1988). Positive selection for male-sterile mutants of *Arabidopsis* lacking adenine phosphoribosyl transferase activity. *Plant Physiology* 86: 1150–1154
- Moffatt, J.D., Jeffrey, K.L., y Cocks, T.M. (2002). Protease-activated receptor-2 activating peptide SLIGRL inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced recruitment of polymorphonuclear leukocytes into the airways of mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 26: 680-684.
- Möhlmann, T., Steinebrunner, I., y Neuhaus, E. (2014). Nucleotides and nucleosides: transport, metabolism, and signaling function of extracellular ATP. *Progress in Botany* 75: 119–144.
- Möhlmann, T., Bernard, C., Hach, S., y Ekkehard Neuhaus, H. (2010). Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biology* 12: 26–34.

- Muñoz, A., Raso, M. J., Pineda, M., y Piedras, P. (2006). Degradation of ureidoglycolate in French bean (*Phaseolus vulgaris*) is catalysed by a ubiquitous ureidoglycolate urea-lyase. *Planta*, 224: 175–184.
- Nakagawa, T., y Kawaguchi, M. (2006). Shoot-applied MeJA suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant and Cell Physiology*, 47: 176–180.
- Nam, M.H., Bang, E., Kwon, T.Y., Kim, Y., Kim, E.H., Cho, K., Park, W.J., Kim, B.G., Yoon, I.S. (2015). Metabolite profiling of diverse rice germplasm and identification of conserved metabolic markers of rice roots in response to long-term mild salinity stress. *-International Journal of molecular. Science*. 16: 21959-21974
- Nanjareddy, K., Arthikala, M.K., Aguirre, A.L., Gómez, B.M., Lara, M. *Journal of Visualized Experiments* e56140
- Nasser, R. R., Fuller, P., y Jellings, J. (2008). Effect of elevated CO₂ and nitrogen levels on lentil growth and nodulation. *Agronomy for Sustainable Development*, 2:175–180.
- Nelson, B. K., Cai, X., y Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal*, 51:1126–1136.
- Nizam, S., Qiang, X., Wawra, S., Nostadt, R., Getzke, F., Schwanke, F., Dreyer, I., Langen, G., y Zuccaro, A. (2019). *Serendipita indica* E5' NT modulates extracellular nucleotide levels in the plant apoplast and affects fungal colonization. *EMBO Reports*, 20: e47430.
- Nobusawa, E. y Ashihara, H. (1983). Purine metabolism in cotyledons and embryonic axes of black gram (*Phaseolus mungo L.*) seedlings. *Journal. Biochemistry*. 15: 1059–1065.
- Nonogaki, H., Bassel, G. W., y Bewley, J. D. (2010). Germination-still a mystery. *Plant Science*, 179: 574–581.
- O'Leary, B. M., Neale, H. C., Geilfus, C. M., Jackson, R. W., Arnold, D. L., y Preston, G. M. (2016). Early changes in apoplast composition associated with defence and disease in interactions between *Phaseolus vulgaris* and the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* Pv. *phaseolicola*. *Plant Cell and Environment*, 39: 2172–2184.

- Oliver, M.J., Guo, L., Alexander, D.C., Ryals, J.A., Wone, B.W., Cushman, J.C. (2011) . A sister group contrast using untargeted global metabolomic analysis delineates the biochemical regulation underlying desiccation tolerance in *Sporobolus stapfianus*. - *Plant Cell* 23: 1231-1248.
- Palatnik-De-Sousa, C. B. (2019). Nucleoside hydrolase NH 36: A vital enzyme for the *Leishmania* genus in the development of T-cell epitope cross-protective vaccines. *Frontiers in Immunology* 10:
- Pedroza-García, J.A., Nájera-Martínez, M., Mazubert, C. (2019). Role of pyrimidine salvage pathway in the maintenance of organellar and nuclear genome integrity. *Plant Journal*. 97: 430–446.
- Peoples, M. B., Atkins, C. A., Pate, J. S., y Murray², D. R. (1985). Nitrogen nutrition and metabolic interconversions of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits?. *Plant Physiology* 77: 382–388.
- Peoples, M. B., Sudin, N., y Herridge, D. F. (1987). Translocation of nitrogenous compounds in symbiotic and nitrate-fed amide-exporting legumes. *Journal of Experimental Botany* 38: 567–579.
- Petersen, C., y Møller, L. B. (2001). The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 276: 884–894.
- Phillips, D. A., Joseph, C. M., y Hirsch, P. R. (1997). Occurrence of flavonoids and nucleosides in agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4573–4577.
- Pietrowska-Borek, M.; Chadzinikolau, T.; Borek, S. (2014). Cyclic nucleotides and nucleotide cyclases in plants under stress.Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes. 119–151
- Pietrowska-Borek, M., Czeakała, Ł., Belchí-Navarro, S., Pedreño, M. A., y Guranowski, A. (2014). Diadenosine triphosphate is a novel factor which in combination with cyclodextrins synergistically enhances the biosynthesis of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* cv. Monastrell suspension cultured cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84: 271–276.

- Pietrowska-Borek, M., Dobrogojski, J., Sobieszczuk-Nowicka, E., y Borek, S. (2020). New Insight into Plant Signaling: Extracellular ATP and Uncommon Nucleotides. *Cells* 9: 345
- Pietrowska-Borek, M., Nuc, K., y Guranowski, A. (2015). Exogenous adenosine 5'-phosphoramidate behaves as a signal molecule in plants; it augments metabolism of phenylpropanoids and salicylic acid in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 144–152.
- Pietrowska-Borek, M., Nuc, K., Zielezińska, M., y Guranowski, A. (2011). Diadenosine polyphosphates (Ap 3A and Ap 4A) behave as alarmones triggering the synthesis of enzymes of the phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Open Bio*, 1:1–6.
- Prinsi, B., y Espen, L. (2015). Mineral nitrogen sources differently affect root glutamine synthetase isoforms and amino acid balance among organs in maize. *BMC Plant Biology*, 15: 96.
- Quiles, F. A., Galvez-Valdivieso, G., Guerrero-Casado, J., Pineda, M., and Piedras, P. (2019). Relationship between ureidic/amidic metabolism and antioxidant enzymatic activities in legume seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 138: 1–8.
- Quiles, F. A., Raso, M. J., Pineda, M., y Piedras, P. (2009). Ureide metabolism during seedling development in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum*, 135: 19–28.
- Qu, F., y Morris, T. J. (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Molecular plant-microbe interactions*, 15: 193–202.
- Raso MJ, Pineda M, Piedras P (2007). Tissue abundance and characterization of two purified proteins with allantoinase activity from French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol Plant* 131:355–366
- Rendón-Anaya, M., Montero-Vargas, J.M., Saburido-Álvarez, S., Vlasova, A., Capella-Gutierrez, S., Ordaz-Ortiz, J. J., Aguilar, O. M., Vianello-Brondani, R. P., Santalla, M., Delaye, L., Gabaldón, T., Gepts, P., Winkler, R., Guigó, R., Delgado-Salinas, A., y Herrera-Estrella, A. (2017). Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biology*, 18: 60.

- Rewers, M., y Sliwinska, E. (2014). Endoreduplication in the germinating embryo and young seedling is related to the type of seedling establishment but is not coupled with superoxide radical accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 65:4385–4396.
- Reynolds, P.H., Blevins, D.G., y Randall, D.D. (1984). 5-Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from soybean root nodules: kinetic and regulatory properties. *Archives of biochemistry and biophysics*, 229: 623–631.
- Ribeiro, J.M.C., y Valenzuela, J.G. (2003). The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:13–22.
- Rieder, B., y Neuhaus, H.E. (2011a). Identification of an *Arabidopsis* plasma membrane-located ATP transporter important for anther development. *Plant Cell*, 23: 1932–
- Rieder, B., y Neuhaus, H.E. (2011b). Identification of an *Arabidopsis* plasma membrane-located ATP transporter important for anther development. *Plant Cell*, 23: 1932–1944.
- Riegler, H., Geserick, C., y Zrenner, R. (2011). *Arabidopsis thaliana* nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation. *New Phytologist*, 191: 349–359.
- Riewe, D., Grosman, L., Fernie, A. R., Zauber, H., Wucke, C., y Geigenberger, P. (2008). A cell wall-bound adenosine nucleosidase is involved in the salvage of extracellular ATP in *Solanum tuberosum*. *Plant and Cell Physiology*, 49
- Rodríguez-Gacio, M. del C., Matilla-Vázquez, M. A., y Matilla, A. J. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signaling y Behavior*, 4:
- Ross, C., y Murray, M. G. (1971). Development of pyrimidine-metabolizing enzymes in cotyledons of germinating peas. *Plant Physiology* 48: 626–630.
- Sautin, Y.Y., y Johnson, R.J. (2008). Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27: 608–619.
- Schmutz, J., McClean, P.E., Mamidi, S., Wu, G.A., Cannon, S.B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S. M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M. A., Chovatia, M.,

- Jackson, S. A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46: 707–713.
- Schubert, K.R. (1986). PRODUCTS OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN HIGHER PLANTS: Synthesis, Transport, and Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*. 37:
- Semba, R.D., Ramsing, R., Rahman, N., Kraemer, K., y Bloem, M. W. (2021). Legumes as a sustainable source of protein in human diets. *Global Food Security* 28.
- Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L. A., Naamala, J., Lyu, D., Rabileh, M., Zajonc, J., y Smith, D. L. (2021). PGPR in Agriculture: A Sustainable Approach to Increasing Climate Change Resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems* .5: 667546
- Shamseldin, A., y Velázquez, E. (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36: 63
- Shelp BJ, Atkins CA (1983) Role of inosine monophosphate oxidoreductase in the formation of ureides in nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata*- L Walp). *Plant Physiology* 72: 1029–1034.
- Schroeder, R., Zhu, A., Eubel, H., Dahncke, K., and Witte, C.-P. (2018). The ribokinases of *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* are required for ribose recycling from nucleotide catabolism, which in plants is not essential to survive prolonged dark stress. *New Phytology*. 217: 233–244.
- Silvente, S., Sobolev, A. P., y Lara, M. (2012). Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. *Plos One*, 7:
- Singh, S. P., Gutierrez, J. A., Molina, A., Urrea, C., y Gepts, P. (1991). Genetic diversity in cultivated common bean: ii. marker-based analysis of morphological and agronomic traits. *Crop Science* 31:23–29.
- Smith, P. M. C., y Atkins, C. A. (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128:793–802.
- Sprent, J.I. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. (1980). *Plant, Cell and Environment* 3: 35–43

- Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A., y Pisante, M. (2017). Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* . 4: 2.
- Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T. A., y Ashihara, H. (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 160:1271–1295.
- Stasolla, C., Loukanina, N., Ashihara, H., Yeung, E. C., y Thorpe, T. A. (2001). Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. *Tree Physiology*, 21: 359–367.
- Stasolla, C., Loukanina, N., Ashihara, H. (2002). Pyrimidine nucleotide biosynthesis and nucleic acid metabolism in embryos and megagametophytes of white spruce (*Picea glauca*) during germination. *Physiology Plant*. 115: 155–165
- Steinebrunner, I., Wu, J., Sun, Y., Corbett, A., y Roux, S. J. (2003). Disruption of apyrases inhibits pollen germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 131:1638–1647.
- Stoddard, A., y Rolland, V. (2019). I see the light! Fluorescent proteins suitable for cell wall/apoplast targeting in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Direct*, 3:1-15
- Sun, J., Cardoza, V., Mitchell, D. M., Bright, L., Oldroyd, G., y Harris, J. M. (2006). Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant Journal*, 46: 961–970.
- Świeżawska, B., Duszyn, M., Jaworski, K., y Szmidt-Jaworska, A. (2018). Downstream targets of cyclic nucleotides in plants. *Frontiers in Plant Science*, 9 1428.
- Tanaka, K., Choi, J., Cao, Y., y Stacey, G. (2014). Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Frontiers in Plant Science* 5: 446.
- Tanaka, K., Gilroy, S., Jones, A. M., y Stacey, G. (2010). Extracellular ATP signaling in plants. *Trends in Cell Biology*. 20: 601–608.
- Tasaki E, Sakurai H, Nitao M, Matsuura K, Iuchi Y (2017) Uric acid, an important antioxidant contributing to survival in termites. *Plos One* 12:1–12.

- Thomas, C., Rajagopal, A., Windsor, B., Dudler, R., Lloyd, A., y Roux, S. J. (2000). A Role for Ectophosphatase in Xenobiotic Resistance. In *The Plant Cell*. 12:
- Thu, S. W., Lu, M. Z., Carter, A. M., Collier, R., Gandin, A., Sitton, C. C., y Tegeder, M. (2020). Role of ureides in source-to-sink transport of photoassimilates in non-fixing soybean. *Journal of Experimental Botany*, 71: 4495–4511.
- Thumuluri, V., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Nielsen, H., y Winther, O. (2022a). DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Research*, 50:228–234.
- Tiedemann J, Neubohn B, Muötz K (2000) Different functions of vicilin and legumin are reflected in the histopattern of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L.). *Planta* 211: 1–12
- Traub, M., Flörchinger, M., Piecuch, J., Kunz, H. H., Weise-Steinmetz, A., Deitmer, J. W., Neuhaus, H. E., y Möhlmann, T. (2007). The fluorouridine insensitive 1 (fur1) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 49: 855–864.
- Tripathi, D., Zhang, T., Koo, A. J., Stacey, G., y Tanaka, K. (2018). Extracellular ATP acts on jasmonate signaling to reinforce plant defense. *Plant Physiology* 176: 511–523.
- Triplett, E.W., Blevins, D.G., y Randall, D.D. (1980). Allantoic acid synthesis in soybean root nodule cytosol via xanthine dehydrogenase. *Plant Physiology* 65: 1203–1206.
- Tyzio, R., Cossart, R., Khalilov, I., Minlebaev, M., Hübner, C. A., Represa, A., Ben-Ari, Y., y Khazipov, R. (2006). Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science*, 314:1788.
- Udvardi, M., y Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. In *Annual Review of Plant Biology* .64: 781–805.
- Urarte, E., Esteban, R., Moran, J. F., y Bittner, F. (2015). Established and Proposed Roles of Xanthine Oxidoreductase in Oxidative and Reductive Pathways in Plants .15–42.
- Veličković, D., Agtuca, B. J., Stopka, S. A., Vertes, A., Koppenaar, D. W., Paša-Tolić, L., Stacey, G., y Anderton, C. R. (2018). Observed metabolic asymmetry within

- soybean root nodules reflects unexpected complexity in rhizobacteria-legume metabolite exchange. *The ISME journal*, 12: 2335–2338.
- Vallejos, C.E., Sakiyama', N.S., y Chase, C.D. (1992). A Molecular Marker-Based Linkage Map of *Phaseolus vulgaris* L.
- Versées, W., y Steyaert, J. (2003). Catalysis by nucleoside hydrolases. In *Current Opinion in Structural Biology* .13: 731–738.
- Versées, W., Van Holsbeke, E., De Vos, S., Decanniere, K., Zegers, I., y Steyaert, J. (2003). Cloning, preliminary characterization and crystallization of nucleoside hydrolases from *Caenorhabditis elegans* and *Campylobacter jejuni*. *Biological crystallography*, 59 :1087-9.
- Vogels, G.D., y Van Der Drift, C. (1970). Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry*.3: 143–157.
- Voß, L., Heinemann, K. J., Herde, M., Medina-Escobar, N., y Witte, C. P. (2022). Enzymes and cellular interplay required for flux of fixed nitrogen to ureides in bean nodules. *Nature Communications*, 13: 5331
- Wang, Y. Y., Hsu, P. K., y Tsay, Y. F. (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*. 17: 458–467.
- Wang, W.S., Zhao, X.Q., li, M., Huang, L.Y., Xu, J.L., Zhang, F., Cui, YR., Fu, B.Y., Li, Z.K. (2016) Complex molecular mechanisms underlying seedling salt tolerance in rice revealed by comparative transcriptome and metabolomic profiling. *Journal of Experimental Botany* 67: 405-419.
- Wani, S. P., Rupela, O.P., y Lee, K.K. (1995). Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. In *Plant and Soil* 174:.
- Watanabe, S., Nakagawa, A., Izumi, S., Shimada, H., y Sakamoto, A. (2010). RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 584: 1181
- Werner, A.K., y Witte, C.P. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: Purine ring catabolism. *Trends Plant Science*. 16: 381– 387.

- Werner, A.K., Sparkes, I.A., Romeis, T., and Witte, C.P. (2008). Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiology* 146: 418–430.
- Wheeler, T. J., Clements, J., y Finn, R. D. (2014). Skyline: a tool for creating informative, interactive logos representing sequence alignments and profile hidden Markov models. *BMC bioinformatics*, 15: 7.
- Witz, S., Jung, B., Fürst, S., y Möhlmann, T. (2012). De Novo pyrimidine nucleotide synthesis mainly occurs outside of plastids, but a previously undiscovered nucleobase importer provides substrates for the essential salvage pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 1549–1559.
- Wolf, C., Hennig, M., Romanovicz, D., y Steinebrunner, I. (2007). Developmental defects and seedling lethality in apyrase *AtAPY1* and *AtAPY2* double knockout mutants. *Plant Molecular Biology*, 64, 657–672.
- Wood, M., Power, J.B., Davey, M.R., Lowe, K.C., y Mulligan, B.J. (1998). Factors affecting single strand-preferring nuclease activity during leaf aging and dark-induced senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 131: 149–159.
- Wu H., Liu X., You L., Zhang L., Zhou D., Feng J., Zhao J., Yu J. (2012) Effects of salinity on metabolic profiles, gene expressions, and antioxidant enzymes in halophyte. *Journal Plant Growth* 31:332–341
- Xu, G., Fan, X., y Miller, A. J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63: 153–182.
- Yobi, A., Wone, B.W., Xu, W., Alexander, D.C., Guo, L., Ryals, J.A., Oliver, M.J., Cushman, J.C. (2013). Metabolomic profiling in *Selaginella lepidophylla* at various hydration states provides new insights into the mechanistic basis of desiccation tolerance. *Molecular Plants* 6: 369-385.
- Young, L.S., Harrison, B.R., Narayana Murthy, U.M, Moffatt B.A., Gilroy S., Masson, P.H. (2006) Adenosine kinase modulates root gravitropism and cap morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142: 564–573
- Yu, J., Wang, J., Lin, W., Li, S., Li, H., Zhou, J., Ni, P., Dong, W., Hu, S., Zeng, C., Zhang, J., Zhang, Y., Li, R., Xu, Z., Li, S., Li, X., Zheng, H., Cong, L., Lin, L., Yang, H.

- (2005). The genomes of *Oryza sativa*: A history of duplications. *Plos Biology*, 3,2: 0266–0281.
- Yupsanis, T., Symeonidis, L., Kalemi, T., Moustaka, H., y Yupsani, A. (2004). Purification, properties and specificity of an endonuclease from *Agropyron elongatum* seedlings. *Plant physiology and biochemistry* 4210: 795–802.
- Zhang, X., y Mou, Z. (2009). Extracellular pyridine nucleotides induce PR gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 57:302–312.
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., y Boldt, R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. In *Annual Review of Plant Biology*. 57: 805–836.