

**Universidad de Córdoba**  
Facultad de Ciencias

**METABOLISMO DE UREIDOS Y  
NUCLEÓTIDOS DURANTE LA  
GERMINACIÓN Y DESARROLLO INICIAL  
DE PLÁNTULAS DE *Phaseolus vulgaris***



Francisco Antonio Quiles Luque

TESIS DOCTORAL

Córdoba 2012

TÍTULO: *Metabolismo de ureidos y nucleótidos durante la germinación y desarrollo inicial de plántulas de Phaseolus vulgaris*

AUTOR: *Francisco Antonio Quiles Luque*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal  
Sección de Fisiología Vegetal



**METABOLISMO DE UREIDOS Y NUCLEÓTIDOS  
DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO  
INICIAL DE PLÁNTULAS DE *Phaseolus vulgaris***

Francisco Antonio Quiles Luque

Córdoba, 2012



# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal  
Sección de Fisiología Vegetal



## METABOLISMO DE UREÍDOS Y NUCLEÓTIDOS DURANTE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO INICIAL DE PLÁNTULAS DE *Phaseolus vulgaris*

Memoria presentada por Francisco Antonio Quiles Luque  
para optar al grado de Doctor en Fisiología Vegetal por la  
Universidad de Córdoba

Directores del Trabajo

Dr. Manuel Pineda Priego  
Catedrático de Universidad

Dr. Pedro Piedras Montilla  
Profesor Titular





**TÍTULO DE LA TESIS:** Metabolismo de ureidos y nucleótidos durante la germinación y desarrollo inicial de plántulas de *Phaseolus vulgaris*.

**DOCTORANDO/A:** Francisco Antonio Quiles Luque.

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

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El licenciado D. Francisco Antonio Quiles Luque ha realizado un trabajo serio y exhaustivo encaminado a su tesis doctoral que le ha permitido el conocimiento de una gran diversidad de técnicas de trabajo en los laboratorios de Bioquímica y Fisiología Vegetal. Esto le permite tener la suficiente destreza para abordar un proyecto de investigación nuevo en el que desarrolle la plena capacidad investigadora. El Ldo. Francisco Antonio Quiles Luque tiene una gran capacidad para el trabajo en equipo y además ha colaborado con gran compañerismo en todas las tareas que se le ha requerido durante su estancia en nuestro laboratorio.

Parte de los resultados de su trabajo han sido presentados en varias reuniones científicas y se han publicado en forma de dos artículos científicos en revistas internacionales con revisores situadas en el primer cuartil del Journal Citation Reports, categoría temática de Plant Sciences.

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

Córdoba, 4 de junio de 2012

Firma de los directores

Fdo.: Manuel Pineda Priego

Fdo.: Pedro Piedras Montilla





*El experimentador que no sabe lo que  
está buscando no comprenderá lo que  
encuentra.*

*Claude Bernard (1813-1878)  
Fisiólogo francés.*

*En realidad, prefiero la ciencia a la  
religión. Si me dan a escoger entre  
Dios y el aire acondicionado, me  
quedo con el aire.*

*Woody Allen*

*Estar preparado es importante, saber  
esperarlo es aún más, pero aprovechar  
el momento adecuado es la clave de la  
vida.*

*Arthur Schnitzler  
Dramaturgo*

*Pensar es el trabajo más difícil que  
existe. Quizá sea ésta la razón por la  
que haya pocas personas que lo  
practiquen.*

*Henry Ford*



**A mis padres y hermanos**

**A Alejandra y al pequeño Edu**



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no es solo el fruto del esfuerzo y trabajo de una persona, también lo es de la colaboración, generosidad, actitud y amistad de muchas personas que me han ayudado a la realización del ingente esfuerzo que representa escribir una Tesis Doctoral.

En primer lugar, he de dar las gracias a los Drs. Manuel Pineda y Pedro Piedras, sin los cuales este trabajo no habría sido posible. Al Dr Manuel Pineda le agradezco el haberme acogido en su grupo de investigación cuando apenas me conocía y sus sabios consejos tanto en el ámbito científico como personal. Al Dr Pedro Piedras le agradezco su apoyo y dirección en el día a día de este trabajo, su preocupación por mí como persona, su amistad y el haber compartido conmigo sus conocimientos científicos y sus valores personales.

Gracias a aquellos con los que he compartido laboratorio durante estos años. A M<sup>a</sup> José, por mostrarme el mundo de los ureidos y ser paciente con los errores cometidos cuando era un completo ignorante. A Rosa, por su inestimable ayuda en los primeros experimentos de Biología Molecular. A Javi, por su amistad, por compartir aficiones musicales y por sus consejos. A Goyi, por estar siempre dispuesto a ayudar y a hacer bromas con todo. Se te agradece mucho tu humor. A la Dra Josefa Alamillo, por su ejemplo de incansable búsqueda de nuevas opciones. A Juanmi, por su trabajo codo con codo, por su sincera amistad, por los ratos compartidos fuera del mundo del laboratorio y, como no, por su humor. A Juanlu, por su amistad y ejemplo de constancia y dedicación. A Rocío, por su cariño, por su amistad y por compartir muchos pensamientos. A Inma, por su cercanía y simpatía, además de por el soplo de aire fresco que ha supuesto su incorporación al grupo. A Luis, por aportar un punto de vista muy peculiar a todos los temas. A Marta, tus geles a primera hora de la mañana no tienen

precio. A Manu, por compartir aficiones además de sitio. A Victor e Isa, con los que el intercambio de material, conocimientos y amistad siempre ha funcionado y por las amenas comidas que hemos pasado. Gracias a Inés y a Conchi, porque siempre han estado dispuestas a solucionar cualquier problema.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional de toda mi familia que me ha animado en los momentos difíciles: a mis padres Loli y Paco por ser como son, y haberme dado todo a cambio de nada pensando siempre en mi felicidad, a mis hermanos Rafa y Edu porque siempre han estado dispuestos a ayudarme cuando los he necesitado, a mis tíos y primos por su interés en el trabajo que realizo y, cómo no, a mi sobrina Alejandra, a cuyo lado los problemas se hacen insignificantes por un momento. A Luisa por sus invitaciones para cenar en familia.

Gracias a mis amigos Santi, Enrique, Paquito, Jose, Paqui..., por saber llevar mis “estoy saliendo por la puerta” cuando realmente me iba a retrasar aun 10 o 20 minutos. En definitiva, a todos los que, de una forma u otra, han formado parte de esta tesis aportando su grano de arena.

Gracias a todos los organismos que han financiado la realización de este trabajo de investigación.

Parte de los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes libros y revistas científicas:

**Quiles FA**, Raso MJ, Pineda M y Piedras P (2009) Ureide metabolism during seedling development in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 135: 19-28

**Quiles FA**, Pineda M y Piedras P (2009) Metabolismo de ureidos durante el desarrollo de la plántula de judía (*Phaseolus vulgaris*). En “Avances en el metabolismo del nitrógeno. De la genómica y la proteómica a las aplicaciones agronómicas, industriales y medioambientales” (Bonete MJ y Martínez RM), pp. 83-88. Editorial Club Universitario

Cabello-Díaz JM, **Quiles FA**, Lambert R, Pineda M y Piedras P (2012) Identification of a novel phosphatase with high affinity for nucleotides monophosphate from common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 54-60

Así mismo se han presentado en los siguientes congresos:

**Quiles FA**, Raso MJ, Piedras P y Pineda M. Implicación de los ureidos en la movilización del nitrógeno durante la germinación de judía (*Phaseolus vulgaris*). IX Congreso Luso-Español de Fisiología Vegetal y XVI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Évora, 2005.



**Quiles FA, Raso MJ, Pineda M y Piedras P.** Metabolismo de ureidos durante la germinación y crecimiento post-germinativo de judía (*Phaseolus vulgaris*). VIII Reunión del Metabolismo del Nitrógeno. Lanzarote, 2006.

**Quiles FA, Piedras P y Pineda M.** Metabolismo de ureidos durante el desarrollo de la plántula de judía (*Phaseolus vulgaris*). IX Reunión del Metabolismo del Nitrógeno. Alicante, 2008.

## ÍNDICE

### ABREVIATURAS MÁS FRECUENTES

<b>I.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.- Estructura y formación de las semillas.....	3
2.- Dormición y germinación de semillas.....	6
2.1.- Dormición.....	6
2.1.- Germinación.....	7
2.2.1.- Imbibición y reanudación del metabolismo.....	7
2.2.2.- Síntesis de proteínas.....	10
2.2.3.- Extensión de la radícula y finalización de la germinación....	12
2.2.4.- Control hormonal de la germinación.....	13
3.- Movilización de reservas.....	14
3.1.- El nitrógeno en la germinación.....	14
3.2.- Los ureidos como moléculas de transporte y almacenamiento de nitrógeno.....	15
4.- Síntesis de ureidos.....	19
4.1.- Síntesis de inosina monofosfato (IMP).....	19
4.2.- Transformación de IMP a ureidos.....	21
5.- Catabolismo de ureidos.....	25
6.- Objetivos.....	30
<b>II.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
1.- Reactivos y productos químicos.....	33
2.- Material vegetal.....	36
3.- Obtención de extractos vegetales.....	37
4.- Determinación de metabolitos.....	37
4.1.- Determinación de proteína soluble.....	37
4.2.- Determinación de amonio y de urea.....	38
4.3.- Determinación de ureidos (alantoína, alantoato y ureidoglicolato) y glioxilato en extractos.....	39
4.4.- Determinación de aminoácidos en extractos.....	40

4.5.- Determinación de globulinas.....	40
5.- Actividades enzimáticas.....	41
5.1.- Determinación de la actividad alantoinasa.....	41
5.2.- Determinación de la actividad que cataliza la degradación del alantoato.....	42
5.3.- Determinación de la actividad que cataliza la degradación del ureidoglicolato.....	42
5.4.- Determinación de la actividad fosfatasa con nucleótidos.....	43
5.4.1.- Determinación colorimétrica.....	43
5.4.2.- Determinación en geles de acrilamida.....	44
5.5.- Determinación de la actividad ureasa.....	45
6.- Cultivos bacterianos.....	45
6.1.- Estirpes bacterianas.....	45
6.2.- Condiciones de cultivo.....	45
6.3.- Medios de cultivo.....	45
6.4.- Obtención de células competentes.....	46
6.5.- Transformación de células competentes.....	46
7.- Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	47
7.1.- Aislamiento y purificación de ARN total de tejidos de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	47
7.2.- Aislamiento de ADN plasmídico.....	48
7.2.1.- Utilización de kit comercial.....	48
7.2.2.- Lisis alcalina y precipitación con iso-propanol.....	48
7.3.- Cuantificación de ácidos nucleicos.....	49
8.- Electroforesis.....	50
8.1.- Electroforesis de ADN.....	50
8.2.- Electroforesis de ARN.....	51
8.3.- Separación electroforética de proteínas.....	51
8.4.- Tinción de los geles de acrilamida.....	53
8.4.1.- Coomassie estándar.....	53
8.4.2.- Coomassie un paso.....	53
9.- Síntesis de ADNc.....	53
10.- Clonación del ADNc codificante de una nucleotidasa.....	55
10.1.- Amplificación de los fragmentos 5'-RACE y 3'-RACE.....	55
10.2.- Amplificación de ADNc completo.....	56

11.- Ligación de moléculas de ADN y vectores plasmídicos.....	56
11.1.- Ligación de moléculas de ADN en pGEM-T.....	56
11.2.- Selección de transformantes con pGEM-T.....	57
11.3.- Ligación de moléculas de ADN en pET30b(+). ....	57
11.4.- Selección de transformantes con pET30b(+). ....	58
12.- Secuenciación de ácidos nucleicos.....	58
13.- Clonación en vector de sobreexpresión.....	58
13.1.- Clonación para sobreexpresar una proteína con posible actividad nucleotidasa.....	58
13.2.- Clonación para sobreexpresar una proteína a partir de un ADNc que codifica una alantoinasa.....	59
14.- Sobreexpresión de una proteína cuyo ADNc codifica una actividad nucleotidasa.....	61
14.1.- Condiciones de expresión.....	61
14.2.- Procedimiento de lisis.....	61
14.3.- Purificación en columna.....	61
15.- Sobreexpresión de una proteína cuyo ADNc codifica una actividad alantoinasa.....	62
15.1.- Condiciones de expresión.....	62
15.2.- Procedimiento de lisis.....	63
15.3.- Purificación en columna.....	63
16.- Procedimiento de diálisis.....	64
17.- Obtención de anticuerpos.....	64
18.- Electrotransferencia y ensayo de Western blot.....	65
18.1.- Detección de proteína heteróloga con la cola de histidinas.....	65
18.2.- Detección de proteína nativa en tejidos vegetales.....	66
19.- Separación de proteínas mediante cromatografía de intercambio iónico (DEAE).....	66
20.- Inmunoprecipitación.....	67
21.- Extracción de proteínas de geles de acrilamida.....	67
22.- Deglicosilación.....	68

23.- Identificación de proteínas por huella peptídica (MALDI-TOF).....	68
24.- Bases de datos y software de predicción y análisis.....	69
24.1.- Bases de datos.....	69
24.2.- Software de predicción y análisis.....	69
<b>III.- RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
1.- Actividades degradadoras de ureidos durante la germinación y posterior desarrollo de plántulas de judía.....	73
1.1.- Ureidos en diferentes especies.....	75
1.2.- Germinación y desarrollo inicial de plántulas de judía.....	75
1.3.- Contenido de ureidos durante la germinación y el desarrollo inicial de judía.....	79
1.4.- Actividades que catalizan la degradación de los ureidos durante la germinación y el desarrollo inicial.....	81
1.5.- Efecto de la sacarosa y del nitrato en la cantidad de ureidos y actividad alantoinasa.....	83
1.6.- Efecto del alopurinol y del fenil-fosforo-diamidato en los niveles de ureidos y en la actividad alantoinasa.....	84
1.7.- Efecto de la eliminación de los cotiledones.....	87
1.8.- Efecto de NaCl durante la germinación y el desarrollo de judía...	90
1.9.- Efecto de la etiolización en la cantidad de ureidos y actividad alantoinasa.....	93
1.10.- Metabolismo de ureidos durante germinación y posterior desarrollo inicial en otras especies de leguminosas.....	94
2.- Expresión de una alantoinasa de judía en <i>E. coli</i> . Obtención de anticuerpos y detección en tejidos de judía.....	97
2.1.- Expresión heteróloga de un ADNc que codifica una alantoinasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	99
2.2.- Purificación de la proteína recombinante.....	100
2.3.- Estudios inmunológicos.....	102
2.3.1.- Anticuerpos policlonales frente a la proteína recombinante Hys-PvALN.....	102
2.3.2.- Análisis de expresión de alantoinasa en distintos tejidos mediante Western blot.....	103
2.4.- Purificación mediante inmunoprecipitación e indentificación de la proteína de 66 kDa por técnica MALDI-TOF/TOF.....	106
2.5.- Cromatografía DEAE-Sephacel de extractos de frutos. Análisis mediante Western blot.....	111

3.- Actividades fosfatasas de nucleótidos durante la germinación y posterior desarrollo de plántulas de judía.....	113
3.1.- Actividades fosfatasas en plántulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	115
3.2.- Actividad fosfatasa resistente a molibdato con distintos sustratos.....	119
3.3.- Actividades fosfatasas en plántulas desarrolladas en presencia de alopurinol y ribavirina.....	122
4.- Expresión de una nucleotidasa de judía en <i>E. coli</i> . Obtención de anticuerpos y detección en tejidos de judía.....	125
4.1.- Clonación de una secuencia que codifica una actividad nucleotidasa.....	127
4.2.- Expresión de un ADNc que codifica una nucleotidasa de <i>Phaseolus vulgaris</i> en <i>E. coli</i> .....	133
4.3.- Purificación de la proteína recombinante Hys-PvP5N.....	134
4.4.- Actividad de la proteína recombinante Hys-PvP5N.....	136
4.5.- Anticuerpos policlonales obtenidos frente a la proteína recombinante Hys-PvP5N.....	138
<b>IV.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>141</b>
<b>V.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>163</b>
<b>VI.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>167</b>



## ABREVIATURAS MÁS FRECUENTES

A	absorbancia
ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosin trifosfato
BCIP	fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol
BrEt	bromuro de etidio
°C	grado Celcius
DDI	días después de imbibición
DTT	1, 4-ditiotreitol
EDTA	sal sódica del ácido etilendiamino tetraacético
EST	expressed sequence tag (etiqueta de secuencia expresada)
<i>g</i>	aceleración de la gravedad
GAs	giberelinas
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
kDa	kilodalton
Km	constante de Michaelis-Menten
LB	medio Luria-Bertani
nm	nanómetro
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PF	peso fresco
Pi	fosfato inorgánico
p:v	peso:volumen



RACE	amplificación rápida de extremos de ADNc
ROS	especie reactiva de oxígeno
SDS	dodecil-sulfato sódico
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
TBE	tampón Tris-ácido bórico-EDTA
T-TBS	tampón Tris-NaCl-Twen
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidad internacional de actividad enzimática
v:v	volumen:volumen
X-gal	(5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido)

## **I.- INTRODUCCIÓN**

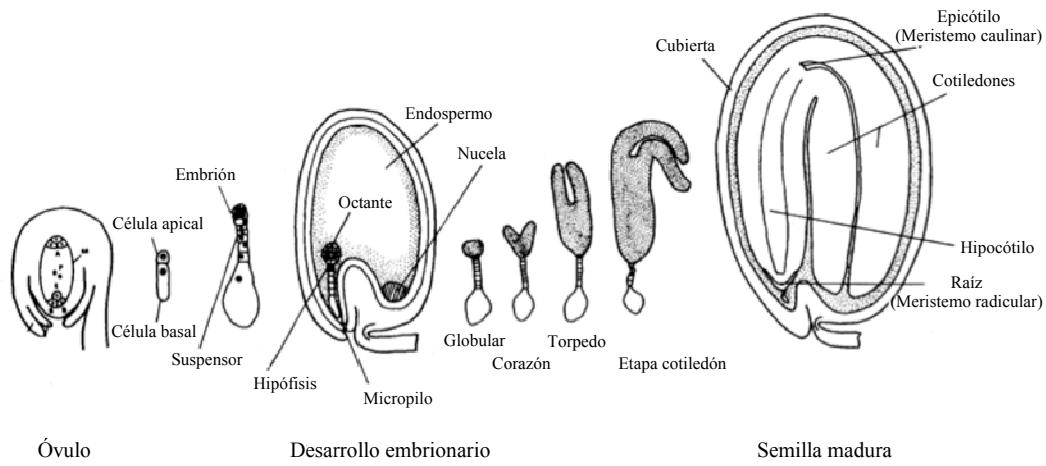


## 1.- ESTRUCTURA Y FORMACIÓN DE LAS SEMILLAS

La aparición de la semilla en el ciclo vital de las plantas superiores constituyó un proceso de adaptación único al asegurar la supervivencia en la generación siguiente aun en condiciones ambientales adversas. La estructura y fisiología de la semilla están adaptadas para su actuación como unidad de dispersión y son consecuencia de la suma de múltiples procesos como cambios morfológicos, estructurales y de expresión génica (Linkies et al. 2010).

La embriogénesis cigótica engloba la formación de la semilla así como la fase de preparación para la germinación. La embriogénesis comienza a partir del cigoto en un proceso que, al principio, es muy similar en mono y dicotiledóneas. En la Figura 1 se esquematiza la embriogénesis en *Arabidopsis thaliana*, que corresponde con la planta dicotiledónea más estudiada y en la que este proceso es más conocido. Tras una fase de expansión y elongación, el cigoto experimenta una división transversal para dar lugar a dos células: la célula apical, que dará lugar a la mayor parte del embrión propiamente dicho, y la célula basal, que originará una pequeña parte del embrión y el suspensor, un tejido que soporta al embrión y conduce los nutrientes desde el tejido materno, degenerando al final del proceso. La célula apical sufre dos divisiones longitudinales y una transversal generando ocho células que constituyen el embrión (etapa octante). A continuación, el embrión pasa por una etapa de intensa proliferación celular que finaliza con una masa de células de forma casi esférica y simetría radial (etapa globular). En este punto, el embrión cambia de simetría radial a simetría bilateral presentando forma de corazón. Se produce la diferenciación tisular y comienzan a distinguirse dos cotiledones a ambos lados del meristemo apical, y el meristemo de la raíz en la zona central e inferior. La embriogénesis continúa con un aumento de tamaño por proliferación y expansión celular. Los tejidos del córtex y del endodermo se diferencian y comienzan a acumular proteínas y lípidos. El embrión se alarga (etapa torpedo) y, a partir de cierta longitud, comienza a curvarse y los cotiledones se doblan

sobre el hipocótilo (etapa cotiledón). El embrión sigue aumentando de tamaño principalmente por expansión celular. Todos estos procesos están altamente controlados a través de una intensa regulación de la expresión de numerosos genes, cuya identidad y función está empezando a determinarse. Algunos de estos genes están relacionados con la síntesis, transporte o percepción de señales hormonales (Pineda 2004).



**Figura 1. Embriogénesis y desarrollo de la semilla en *Arabidopsis*.** Adaptado de Castle y Meinke (1993).

El desarrollo de la semilla se puede dividir en función de la masa de ésta a lo largo del tiempo en dos fases: de pre-almacenamiento y de almacenamiento. La primera está marcada por la división celular de los tejidos del embrión y la expansión de las células del endospermo y de la cubierta (Borisjuk et al. 1995). Esta fase es muy sensible a los cambios en la actividad fotosintética en hojas llegando a comprometerse en este estadio el tamaño y número de semillas por vaina (Toker 2004). Con el desarrollo del embrión, éste pasa de depender del

suministro ofrecido por el endospermo a hacerlo del aporte ofrecido por la cubierta que comienza a especializarse en el paso de nutrientes hacia el embrión.

El paso a la segunda fase se produce a través de un proceso de transición con características comunes a ambas fases. Durante este proceso, la división celular, la expansión celular y el almacenamiento de sustancias de reserva se intercalan en el tiempo en forma de ondas secuenciales a través de los tejidos del cotiledón (Patrick y Stoddard 2010). Las células del cotiledón en *Vicia faba* se expanden, sintetizan proteínas de almacenamiento y almidón, y se someten a endopoliploidización durante el proceso de transición (Borisjuk et al. 1995). La fase de almacenamiento se caracteriza por el llenado de los cotiledones en ausencia de división celular y el mantenimiento de la función de la cubierta en el paso de sustancias.

Durante la embriogénesis se producen importantes cambios hormonales. Así, en las primeras fases, de alta actividad mitótica, se produce síntesis de citoquininas, implicadas en la formación de elementos vasculares (Mahonen et al. 2000; Inoue et al. 2001), y de giberelinas en el suspensor (Picciarelli et al. 1994; Solfanelli et al. 2005). También incrementan las poliaminas como espermidina y espermina, con efectos sobre la mitosis (Baron y Stasolla 2008). En la fase intermedia (torpedo), caracterizada por la expansión celular, existe un alto contenido de auxinas libres y conjugadas, sintetizadas por los tejidos de la propia semilla, y se produce un descenso de las citoquininas. En la etapa final de preparación para la desecación, juega un papel fundamental el ácido abscísico y ya no se detectan auxinas ni giberelinas (De Smet et al. 2010).

La desecación de la semilla supone el final del desarrollo y maduración, y la entrada del embrión en un estado de quiescencia o dormición, proceso controlado por ácido abscísico. La tolerancia a la desecación se produce al final de la maduración mediante incrementos importantes en algunos oligosacáridos (rafínosa, verbascosa, estaquiosa), la pérdida de agua y la inducción de la síntesis de proteínas LEA (Rai et al. 2011). El contenido en agua de las semillas

puede llegar a niveles del 5-10% sin sufrir daños en la viabilidad del embrión, denominándose semillas ortodoxas. Las proteínas LEA se unen a estructuras subcelulares, membranas fundamentalmente, y a otras proteínas para protegerlas del efecto negativo que supone la pérdida de agua. Algunas proteínas LEA también se han implicado en el control de la pérdida de agua por parte de la semilla evitando la desecación prematura (Manfre et al. 2009). La tolerancia a la desecación es una respuesta multifactorial y sinérgica en la que cada componente es igualmente crítico. Finalmente, la semilla entra en un proceso de dormición que le impide germinar en la propia planta (viviparismo) y le permite sobrevivir en condiciones adversas.

La maduración de la semilla se considera completada cuando se ha producido la acumulación de compuestos de reserva, ha descendido el contenido de agua, los niveles de ácido abscísico han incrementado, y se han establecido la tolerancia a la desecación y la dormición primaria (Holdsworth et al. 2008).

## **2.- DORMICIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS**

### **2.1.- Dormición.**

Semillas en dormición son aquellas incapaces de completar la germinación bajo condiciones favorables siendo semillas viables e intactas. Todos los acontecimientos celulares y metabólicos que ocurren antes de completar la germinación de semillas no durmientes ocurren también en semillas durmientes embebidas (Bewley 1997). La dormición se divide en primaria o secundaria, dependiendo si la capacidad germinativa de la semilla esté impedida antes o después de su dispersión, respectivamente. Esto no es óbice para que existan otros tipos de dormición. La dormición debe ser eliminada por el mecanismo apropiado para que la semilla pueda germinar. La deficiencia en ácido abscísico durante el desarrollo de la semilla se ha asociado con la ausencia de dormición primaria, mientras que el incremento del contenido de ácido abscísico en la semilla mediante la sobreexpresión de los genes responsables de su biosíntesis

puede aumentar la dormición de la semilla o retrasar la germinación (Finkelstein et al. 2002; Nambara y Marion-Poll 2003; Kushiro et al. 2004). De esta forma, las semillas con inhibición de la síntesis de ácido abscísico o falta de sensibilidad al ácido abscísico presentan dormición secundaria o viviparismo. Únicamente el ABA sintetizado por el propio embrión produce una dormición primaria duradera de este (Le Page-Degivry y Garello 1992). Tratamientos con temperaturas de 4 °C (estratificación) en semillas de *Arabidopsis* embebidas en oscuridad producen un aumento en giberelinas, al aumentar su síntesis y disminuir su degradación, incrementando la capacidad germinativa de las semillas (Yamauchi et al. 2004).

El etileno podría actuar como un control superior de las hormonas implicadas en la dormición y la germinación. Los resultados obtenidos en semillas de *Arabidopsis* que presentan mutaciones en los receptores de etileno *etr1* sugieren la existencia de una interrelación entre el etileno y las giberelinas, ácido abscísico, auxinas y/o citoquininas durante el proceso de dormición y germinación de la semilla (Chiwocha et al. 2005).

## **2.2.- Germinación**

La germinación de la semilla implica la recuperación de su actividad y se define como la suma de eventos que comienza con la hidratación de la semilla seca y culmina en la emergencia del eje embrionario a través de la cubierta seminal. Para ello, es necesaria la conjunción de ciertas condiciones ambientales favorables como un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno y una temperatura adecuada (Nonogaki et al. 2010).

### 2.2.1.- Imbibición y reanudación del metabolismo.

El desarrollo de la nueva plántula, que comienza con la toma de agua por parte de la semilla seca, consta de tres fases (Figura 2): hidratación, germinación y crecimiento (Bewley 1997). En la primera fase tiene lugar una intensa absorción

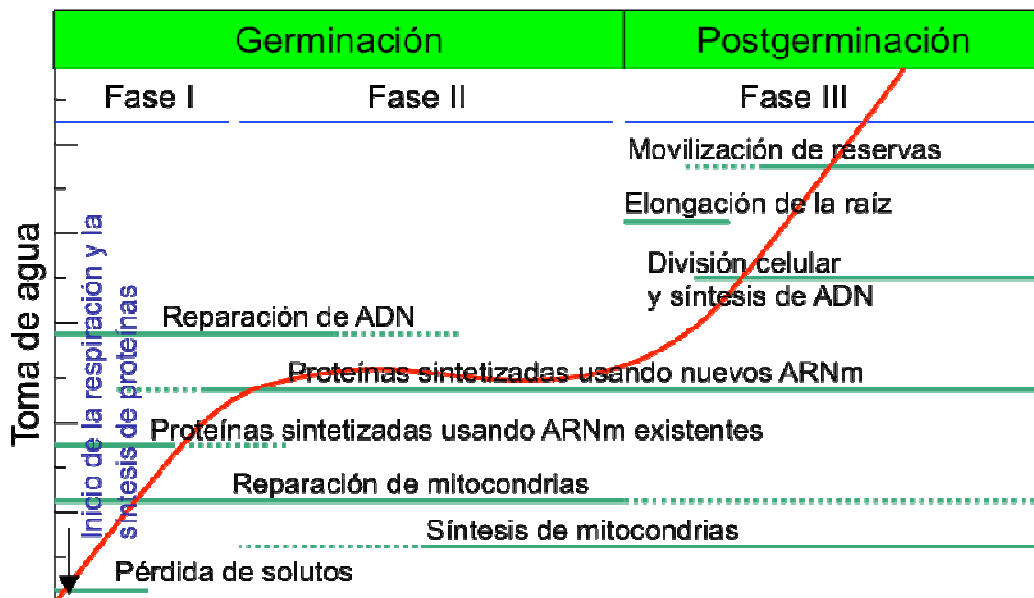


de agua (imbibición) por los distintos tejidos de la semilla y un aumento paralelo de la actividad respiratoria. En la segunda fase se produce una ralentización en la absorción de agua. Esta fase representa el proceso de germinación propiamente dicho y en ella se producen las transformaciones metabólicas necesarias para el correcto desarrollo de la plántula. La tercera fase o fase de crecimiento se asocia con la emergencia de la radícula, volviendo a aumentar la absorción de agua y la actividad respiratoria. Una semilla durmiente no completa la germinación por lo que no puede entrar en la Fase III.

La entrada de agua en las semillas durante la Fase I produce perturbaciones temporales en las estructuras celulares, especialmente en membranas, lo que da lugar a una pérdida rápida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular al medio que rodea a la semilla (Bewley 1997). Esto se debe a la transición de los fosfolípidos de las membranas del estado gel alcanzado durante la maduración y desecación hasta un estado normal de hidratación líquido cristalino. Este cambio se realiza en un periodo corto de tiempo, restringiéndose así la pérdida excesiva de solutos. El mecanismo por el que se reparan los daños producidos en las membranas y orgánulos por los procesos de desecación y rehidratación de la semilla es aún desconocido. Durante la germinación de semillas de algodón se ha descrito un aumento de la cantidad de N-acetil-fosfatidil-etanolamina, un fosfolípido con propiedades estabilizadoras de membrana, que podría estar implicado en el mantenimiento y mejora de la integridad de las membranas (Sandoval et al. 1995).

La actividad metabólica se reanuda tras la imbibición utilizando las estructuras y enzimas presentes en la semilla seca. La entrada de agua durante la imbibición produce la reactivación o sustitución de los componentes del metabolismo que en pocas horas son totalmente funcionales (Figura 2). Uno de los primeros cambios es la recuperación de la actividad respiratoria que se detecta en minutos. Tras este aumento inicial del consumo de oxígeno, se produce un descenso hasta que la raíz penetra en las estructuras que la rodea. La

glucólisis y la ruta oxidativa de las pentosas fosfato se reanudan durante la Fase I y se activan las enzimas del ciclo de Krebs (Nicolas y Aldasoro 1979; Salon et al. 1988). Muchas semillas en germinación producen etanol como resultado de una deficiencia interna de oxígeno causada por la restricción a la difusión de gases de las estructuras que rodean la semilla y por la densidad de la estructura interna (Kennedy et al. 1992). Esta deficiencia en oxígeno puede dar lugar a una mayor producción de piruvato en lugar de utilizar las actividades del ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones (Bewley 1997).



*Figura 2. Representación de los principales eventos asociados con la germinación y posterior crecimiento. El rango de tiempo varía entre horas y semanas dependiendo de la especie y las condiciones de germinación. Adaptado de Bewley (1997).*

Las semillas embebidas generan especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la toma de agua (Wojtyla et al. 2006), moléculas que se han implicado en la salida del estado de dormición (Oracz et al. 2007, 2009). También se han

descrito en semillas secas la presencia de actividades enzimáticas implicadas en la eliminación de estas especies reactivas de oxígeno (superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa...) (Wojtyla et al. 2006)

Aunque poco diferenciadas, los tejidos de semillas secas maduras contienen mitocondrias con suficientes enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas terminales para generar el ATP necesario en el metabolismo inicial tras la imbibición (Morohashi 1986; Attucci et al. 1991). Durante la germinación aparecen dos patrones de desarrollo en las mitocondrias dependiendo del tipo de reservas almacenadas. En semillas que acumulan almidón predomina la reparación y activación de orgánulos preexistentes, mientras que en semillas oleaginosas suelen producir nuevas mitocondrias (Morohashi y Bewley 1980; Morohashi 1986). En embriones de maíz en germinación, la biogénesis de mitocondrias implica la síntesis de las subunidades de la citocromo c oxidasa codificadas por el genoma mitocondrial seguido en pocas horas por la síntesis de las subunidades codificadas por el genoma nuclear (Ehrenshaft y Brambl 1990). Esto implica la coordinación de los genomas mitocondrial y nuclear durante los primeros estadios de la germinación.

### 2.2.2.- Síntesis de proteínas.

Todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas, excepto los polisomas, están presentes en las células de embriones maduros. Tras el inicio de la imbibición, el número de ribosomas libres desciende al formar nuevos polisomas para la síntesis de proteínas. Por tanto, la síntesis inicial de proteínas es dependiente de los ribosomas preexistentes en la semilla seca, aunque pocas horas después, tras el ensamblaje de los polisomas, se forman y utilizan nuevos ribosomas (Bewley 1997).

El ARNm se encuentra en las semillas secas como se ha descrito en *Arabidopsis* (Nakabayashi et al. 2005), trigo (Sreenivasulu et al. 2008) y arroz (Howell et al. 2009), aunque no se ha demostrado si en las semillas secas se

produce la transcripción del ADN y la síntesis de proteínas. En tabaco se han observado niveles bajos de transcripción y traducción durante el inicio de la imbibición (Leubner-Metzger 2005). Muchos de estos mensajeros están asociados con la maduración de la semilla por lo que se denominan mensajeros almacenados o residuales (Ishibashi y Minamikawa 1990), aunque también podrían ser utilizados de forma transitoria durante los estadios iniciales de la germinación (Figura 2). Un inhibidor de la transcripción, la  $\alpha$ -amanitina, no inhibió la germinación en *Arabidopsis* mientras que la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, impidió la aparición de la radícula. Esto indica que las proteínas sintetizadas *de novo* a partir del ARNm almacenado permiten completar la germinación (Rajjou et al. 2004). El ARNm almacenado y utilizado durante los estadios iniciales de imbibición es esencial para completar la germinación (Nonogaki et al. 2010). Los ARNm que codifican proteínas importantes durante la maduración y pérdida de agua de la semilla, como por ejemplo las proteínas LEA, son degradados rápidamente tras la imbibición, mientras que los que codifican proteínas necesarias durante el inicio de la germinación son sustituidos por nuevos mensajeros (Jiang y Kermodé 1994; Han et al. 1997).

La mayoría de los genes inducidos tras 3 horas de imbibición en *Arabidopsis* están asociados con el metabolismo primario, lo que corrobora el hecho de que el reestablecimiento de la actividad respiratoria es uno de los primeros pasos tras la entrada de agua en la célula (Preston et al. 2009). Este proceso se lleva a cabo en semillas durmientes y no durmientes. Sin embargo, los genes que codifican proteínas ribosomales se inducen solo en semillas no durmientes, lo que sugiere que la síntesis de nuevos ribosomas es un paso necesario para completar la germinación (Preston et al. 2009). La regulación de la germinación podría consistir en la suma de dos procesos, la eliminación selectiva de determinados transcritos y la síntesis *de novo* de otros. En la

actualidad, la búsqueda de proteínas marcadores con un papel exclusivo en la germinación continúa.

### 2.2.3.- Extensión de la radícula y finalización de la germinación.

La extensión o elongación de la radícula a través de las estructuras que rodean al embrión es el evento que termina la germinación y marca el comienzo del crecimiento de la plántula. La extensión de la radícula puede ser la consecuencia de dos procesos complementarios: la modificación de la presión de turgencia y la eliminación de la resistencia ofrecida tanto por los tejidos de la radícula como por los que la rodean. En *Arabidopsis*, la elongación es consecuencia exclusivamente de la expansión celular producida en una zona intermedia entre el hipocótilo y la radícula y no de la división celular (Sliwinska et al. 2009). De esta forma, se sabe que las semillas de *Medicago truncatula* completaron la germinación en presencia de un inhibidor de la mitosis (Gimeno-Gilles et al. 2009).

Los mecanismos utilizados para la toma de agua no se conocen aunque se piensa que las acuaporinas deben de estar implicadas. El tratamiento de *Arabidopsis* con mercurio, inhibidor de las acuaporinas, retrasó la germinación entre 25-30 horas (Vander Willigen et al. 2006). La entrada de agua en la célula se debe a los cambios en el potencial osmótico de las células de la radícula que podría volverse más negativo por la acumulación de solutos provenientes de la hidrólisis de los polímeros almacenados. La entrada de agua incrementaría la presión de turgencia y se produciría la extensión de las células. No obstante, las fluctuaciones de metabolitos de pequeña masa molecular durante la germinación parecen ser mayores fuera de la discreta región de elongación (Nonogaki et al. 2010).

Los tejidos que rodean la radícula deben disminuir la resistencia ofrecida para facilitar la extensión. El endospermo se debilita por la acción de hidrolasas como xiloglucano endotransglicosilasa (XTH),  $\beta$ -glucanasas y endo- $\beta$ -

mananastas (Bewley 1997). Igualmente, las expansinas actuarían sobre los puentes de hidrógeno entre los polímeros de la pared celular provocando la extensión de la pared celular de las células de la radícula y en consecuencia la elongación de ésta (Chen et al. 2001; Gimeno-Gilles et al. 2009).

El modelo propuesto para el desarrollo de la germinación se basa principalmente en dicotiledóneas aunque trabajos recientes en monocotiledóneas sugieren que siguen un modelo similar (Fujino et al. 2008). En cereales, algunos tejidos embrionarios como el epiblasto y la coleorriza que cubren la radícula pueden jugar un papel importante en el control de la germinación (Barrero et al. 2009). En estos tejidos, se ha observado la formación de vacuolas en sus células y de grandes espacios intercelulares que producen su debilitamiento permitiendo la rotura. En dicho proceso está implicado un gen cuya función aún no se conoce y cuya expresión se ha observado en germinación de semillas de arroz en condiciones de bajas temperaturas (Fujino et al. 2008).

#### 2.2.4.- Control hormonal de la germinación.

La germinación está fuertemente regulada y es el resultado de un equilibrio entre factores represores e inductores, la mayoría de los cuales actúan durante la Fase II promoviendo o inhibiendo la entrada en la Fase III. La teoría de balance hormonal postula que la capacidad de germinación sería consecuencia del balance de dos hormonas antagonistas como son el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GAs), que producen inhibición e inducción, respectivamente (Seo et al. 2009). Las giberelinas son necesarias para la germinación de las semillas (Koornneef y Vanderveen 1980), de tal forma que mutantes de *Arabidopsis* incapaces de generar las formas activas de las giberelinas germinan solo cuando se les aplica GAs exógenamente (Mitchum et al. 2006). El ácido abscísico actuaría como antagonista de las giberelinas durante la germinación y sus niveles durante la imbibición de *Arabidopsis* se controlan por la expresión del gen que codifica la ABA 8'-hidroxilasa que inactiva el ABA (Nambara y

Marion-Poll 2005). La mutación de este gen produce hiperdormición en las semillas (Kushiro et al. 2004). También se ha descrito la inactivación del ABA durante la germinación mediante la formación de ésteres con glucosa (Chiwocha et al. 2005). Ambas hormonas interactúan entre sí, de tal forma que el ácido abscísico inhibe la síntesis de giberelinas e induce la inactivación de éstas. La regulación final del balance de estas hormonas sería el punto de convergencia de factores ambientales como luz, temperatura y nutrición. El mecanismo de acción no se conoce, aunque las interacciones entre fitocromos y determinadas proteínas actuarían como factores de transcripción que controlarían el metabolismo de las hormonas ácido abscísico y giberelinas (Seo et al. 2009).

### **3.- MOVILIZACIÓN DE RESERVAS**

Durante la germinación y el crecimiento post-germinativo, las plántulas presentan un comportamiento heterotrófico al ser totalmente dependientes de las reservas almacenadas en la semilla. Al final de estos periodos, las plántulas deben pasar a un comportamiento foto-autótrofo antes de que las reservas de nutrientes se agoten. Las reservas nutritivas de las semillas se encuentran en cuerpos intracelulares ricos en lípidos, proteínas y carbohidratos. Su movilización requiere un proceso previo de hidrólisis y en muchos casos de transformaciones metabólicas que facilitan su transporte hasta los órganos en desarrollo de la plántula.

#### **3.1.- El nitrógeno en la germinación.**

El nitrógeno se encuentra almacenado en las semillas en forma de proteínas de reserva y diferentes metabolitos de pequeño tamaño. Durante la germinación y el crecimiento de plántulas, las proteínas de reserva son movilizadas y metabolizadas (Shutov et al. 2003). En consecuencia, hay una gran liberación de aminoácidos y un amplio cambio en la proporción de éstos dentro de las primeras horas tras la imbibición (Glevarec et al. 2004; Anzala et al. 2006). La

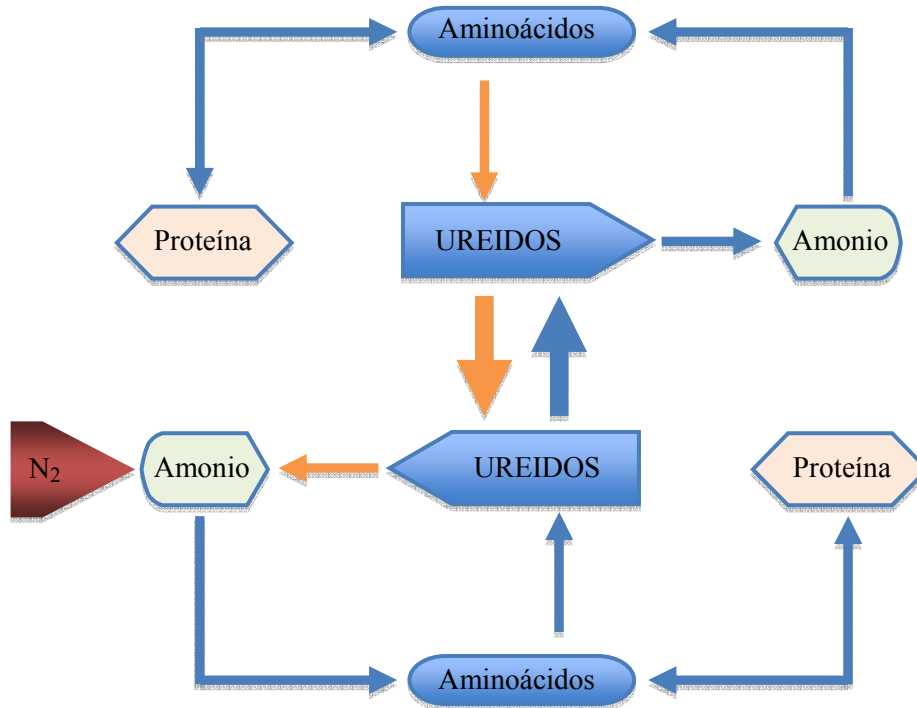
movilización de proteínas comienza antes en ejes embrionarios que en los cotiledones, donde la movilización solo se produce después de que las reservas de los ejes se hayan agotado (Tiedemann et al. 2000). Los aminoácidos liberados en el proceso de movilización de proteínas pueden ser utilizados de forma independiente como bloques para la síntesis de proteínas o como precursores de metabolitos clave.

### **3.2.- Los ureidos como moléculas de transporte y almacenamiento de nitrógeno.**

Los ureidos poseen los rasgos necesarios para actuar como moléculas ideales de transporte y almacenamiento de nitrógeno (Schubert y Boland 1990; Smith y Atkins 2002). Es decir: a) son relativamente solubles en sistemas acuosos; b) poseen baja reactividad química y son relativamente estables; c) constituyen una forma concentrada de nitrógeno orgánico, ya que tienen una alta relación N:C, lo que puede suponer un ahorro significativo de carbono (Smith y Atkins 2002); d) su síntesis es menos costosa que la de otros metabolitos usados como transportadores de nitrógeno en términos de ATP y por átomo de nitrógeno; y e) constituyen una fuente fácilmente disponible de nitrógeno reducido, ya que producen amonio o actúan como donadores de grupos amino en el metabolismo, con lo que se puede recuperar el gasto energético invertido en su síntesis.

Debido a estas características, los ureidos desempeñan ciertas funciones de interés biológico para las plantas y el denominado “ciclo ureido” (Figura 3) relaciona los procesos de síntesis y degradación de los ureidos (Schubert y Boland 1990). A este respecto, en algunas especies perennes, como el arce, la concentración de ureidos es muy alta en las raíces latentes. En la primavera, estos compuestos son exportados a las hojas en desarrollo donde se metabolizan y el nitrógeno liberado se usa para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. En otoño, el proceso se invierte y estas macromoléculas se degradan en las hojas senescentes, empleándose el nitrógeno liberado para sintetizar ureidos que se



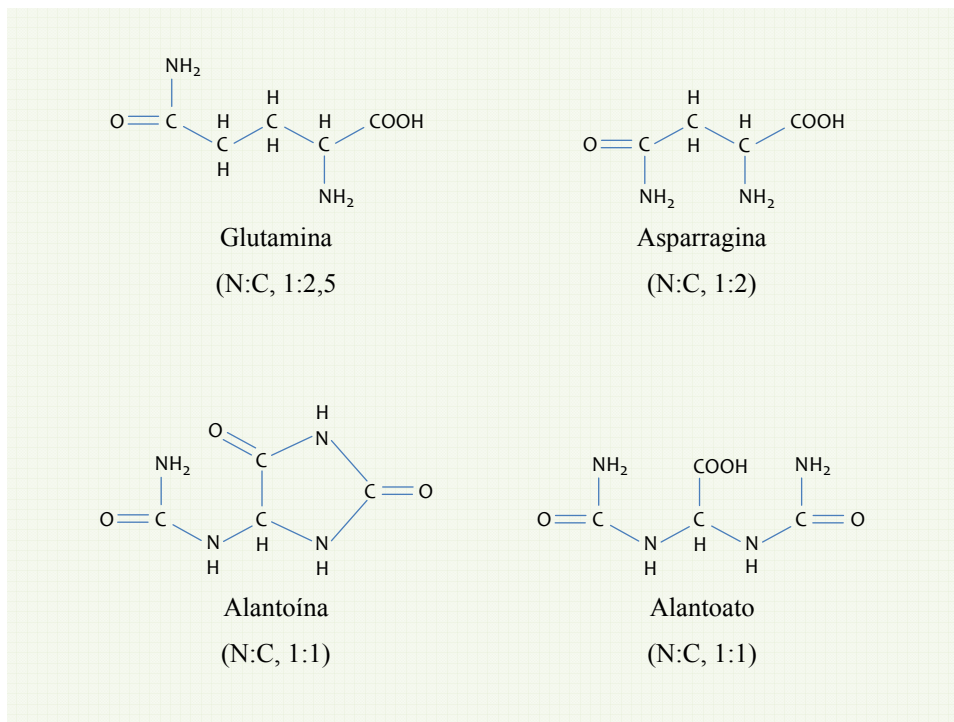


**Figura 3. “Ciclo ureido”.** Las transformaciones entre formas orgánicas e inorgánicas de nitrógeno representadas en este ciclo hipotético pueden ocurrir estacionalmente, durante diferentes etapas del crecimiento y desarrollo, o como resultado de cambios en la fuente de nitrógeno y/o carbono. Adaptado de Schubert y Boland (1990).

transportan a las raíces donde se acumulan (Schubert y Boland 1990). El análisis de la expresión del gen que codifica la alantoinasa en *Robinia pseudoacacia* confirma estos cambios estacionales (Yang y Han 2004). En cultivos *in vitro* de ejes de soja se ha descrito la utilización de urato y alantoína como única fuente de nitrógeno, en contraposición a garbanzo, demostrándose la capacidad que presentan las células de tejido no nodular para diferenciarse ultraestructuralmente y capacitarse para metabolizar ureidos en determinadas leguminosas (Bulbul et al. 2008). El ciclo ureido también podría tener importancia durante la formación de semillas y el desarrollo de las plántulas (Schubert y Boland 1990). Los ureidos son importados a tejidos vegetativos y reproductores donde se emplean para sintetizar las proteínas de reserva de la semilla. Durante la germinación de la semilla, el proceso se invierte y se

formarían ureidos a partir de las reservas proteicas de las semillas, los cuales se usarían como fuente de nitrógeno para el desarrollo de la plántula.

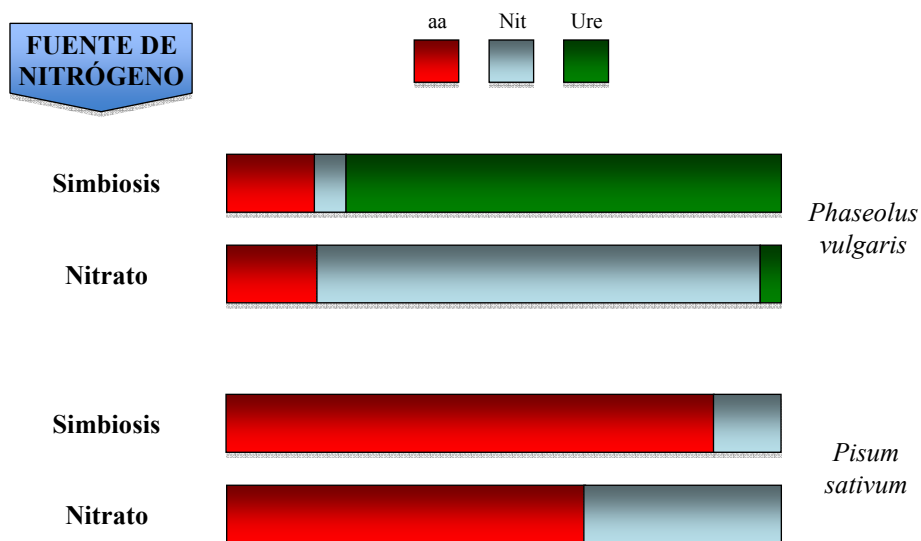
El proceso en el que los ureidos juegan un papel crucial y que está mejor estudiado se corresponde con el transporte del nitrógeno fijado desde nódulos radicales hasta el resto de tejidos en las leguminosas ureídicas. El nitrógeno fijado y asimilado en el nódulo radical debe ser transportado por el xilema hasta las partes aéreas de la planta. Se puede transportar como amidas (glutamina y fundamentalmente asparragina) o como ureidos (alantoína y alantoato) (Figura 4), lo que da lugar a dos grupos de leguminosas, amídicas o ureídicas, respectivamente (Schubert 1986). Entre las leguminosas amídicas se encuentra el guisante, el haba, el altramuz, *Lotus japonicus*, la alfalfa, *Medicago*



**Figura 4. Formula estructural de las principales amidas y ureidos transportados a través del xilema.** Los ureidos (alantoína y alantoato) tienen una relación N:C de 1:1, por lo que presentan una ventaja en términos de nitrógeno exportado y eficiencia en la utilización de carbono sobre las amidas que, como máximo (en el caso de la asparragina), alcanzan una relación N:C de 1:2.

*truncatula*, la lenteja, el garbanzo, etc. (Atkins 1991). Miembros de seis de las ocho subtribus de las Phaseolae son ureídicas, como la soja, la judía, el frijol de vaca, *Vigna radiata*, *Canavalia ensiformis*, etc. También pertenecen a las ureídicas miembros de la tribu Desmoidiae y el guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) de la tribu Indigofoerae (Atkins 1991; Smith y Atkins 2002).

La composición de la fracción nitrogenada del xilema en las leguminosas amídicas es similar en plantas cultivadas con nitrato y en plantas que realizan la fijación simbiótica del dinitrógeno (Figura 5). En cambio, las ureídicas transportan mayoritariamente ureidos solo cuando la planta se encuentra fijando dinitrógeno simbióticamente, siendo el nitrato y los aminoácidos (principalmente asparragina) las formas nitrogenadas fundamentales en plantas cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno (Figura 5). Este cambio en la composición del xilema ocurre igualmente cuando una planta ureídica cultivada en condiciones de fijación se riega con amonio o nitrato, debido al efecto inhibitor del nitrógeno inorgánico sobre la fijación simbiótica (Gan et al. 2004;



**Figura 5.** Composición de la fracción nitrogenada de la savia bruta en función de la fuente de nitrógeno que está usando. *Phaseolus vulgaris* es una leguminosa ureídica típica. *Pisum sativum* es una leguminosa amídica. Los datos para construir este esquema han sido tomados de Diaz-Leal et al. (2012) y Peoples et al. (1987). aa, aminoácidos; Nit, nitrato; Ure, ureidos.

Herridge et al. 2005). Los ureidos se han encontrado también en el xilema de leguminosas típicamente amídicas representando hasta el 10% del nitrógeno que se transporta como asparragina. El origen de estos ureidos parece ser la degradación de los ácidos nucleicos que acompaña a la senescencia (Smith y Atkins 2002).

#### **4.- SÍNTESIS DE UREIDOS**

Los ureidos se producen por oxidación enzimática de las purinas. En animales y microorganismos, la síntesis de ureidos es consecuencia del reciclaje de las purinas durante el metabolismo normal de nucleótidos y ácidos nucleicos. Los nucleótidos pueden ser sintetizados *de novo* a partir de aminoácidos y otras moléculas pequeñas, o a partir de sus correspondientes bases y nucleósidos mediante rutas de reciclaje (Zrenner et al. 2006). Estas rutas pueden ser especialmente importantes en tejidos vegetativos donde el mantenimiento del “pool” de nucleótidos se llevaría a cabo mediante el reciclaje de los nucleósidos existentes y, en menor medida, por síntesis *de novo*. En contraste, la síntesis *de novo* es el principal método utilizado para el mantenimiento de dicho “pool” en tejidos en división y crecimiento. En leguminosas ureídicas se observa una extraordinaria capacidad de sintetizar purinas *de novo* en los nódulos (Schubert 1986; Atkins et al. 1997).

##### **4.1.- Síntesis de inosina monofosfato (IMP).**

La ruta consta de diez reacciones enzimáticas secuenciales que parten de fosforribosil pirofosfato (PRPP) y llegan a IMP, que es el primer producto con el anillo púrico completo. La organización estructural de las enzimas de la ruta difiere entre organismos procariotas y eucariotas, siendo también distinta dentro de los eucariotas. En las plantas, esta organización se parece más a la de procariotas que a la de otros eucariotas (Smith y Atkins 2002). Los niveles de las enzimas implicadas en la síntesis de las purinas y de sus precursores son más

elevados en los nódulos de las leguminosas ureídicas que en los de las amídicas (Schubert 1986).

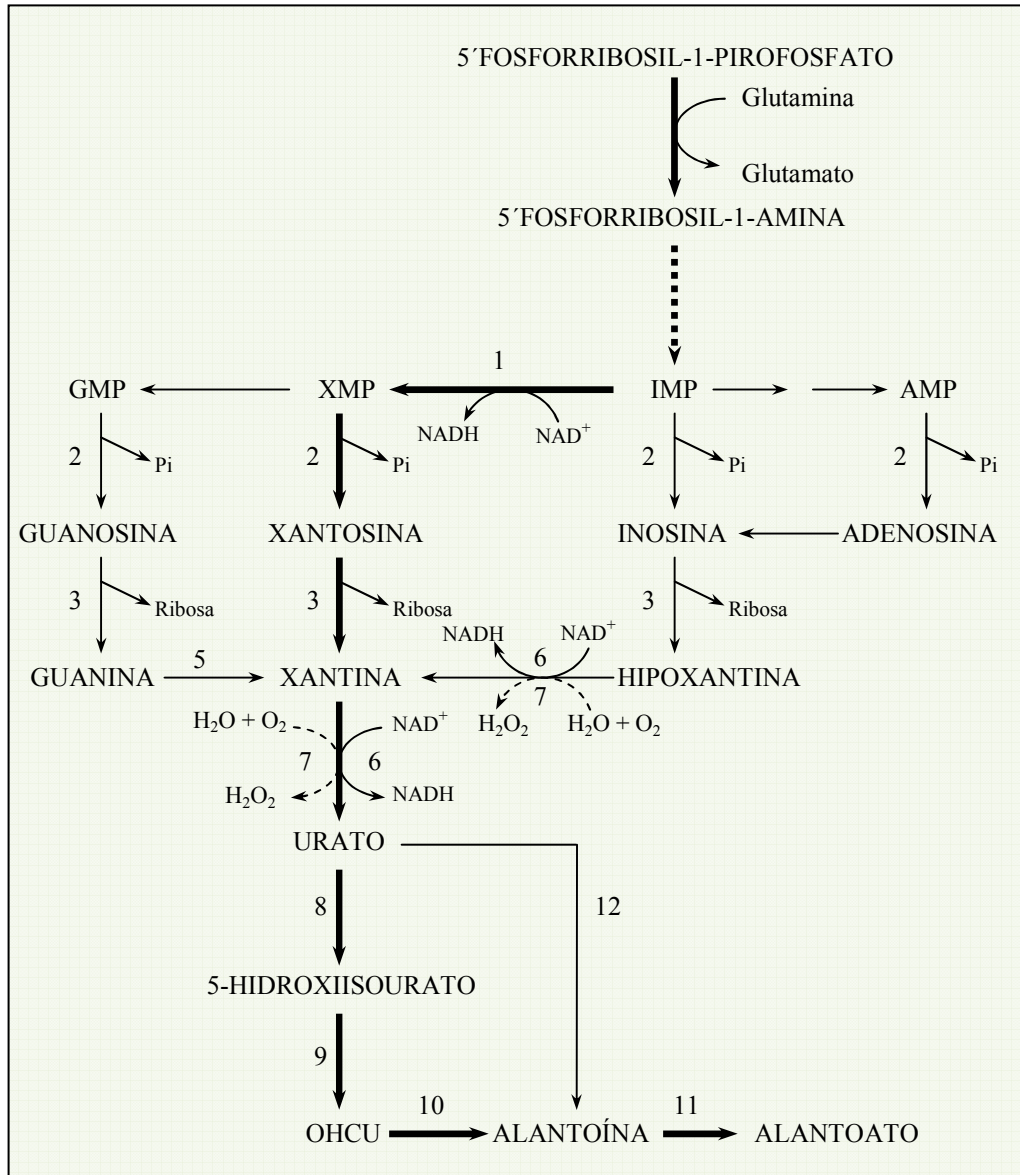
El primer paso de la ruta, catalizado por la fosforribosil pirofosfato amidotransferasa (PRAT; EC 2.4.2.14), sintetiza 5-fosforribosil-1-amina usando como sustratos la glutamina procedente de la asimilación del dinitrógeno fijado y el fosforribosil pirofosfato. Esta enzima se induce durante el desarrollo del nódulo en paralelo a la inducción de la actividad fijadora de nitrógeno y está sometida a inhibición competitiva por los productos finales de la síntesis de purinas (IMP, GMP y XMP) (Reynolds et al. 1984). Además, la expresión del gen que codifica la PRAT se incrementa en presencia de glutamina, el producto de la asimilación del nitrógeno fijado (Kim et al. 1995). La expresión de otros genes de la ruta se reprime en ausencia de fijación de  $N_2$  (Smith y Atkins 2002; Smith et al. 2002). Por tanto, existe un nexo de unión entre la fijación del  $N_2$  y la asimilación del nitrógeno fijado. De igual forma, cuando se bloquea la biosíntesis de purinas mediante alopurinol (inhibidor de la xantina deshidrogenasa) el nitrógeno fijado no se asimila, se inhibe la fijación de nitrógeno y los nódulos comienzan a fenecer (Atkins et al. 1992). De forma similar, cuando se bloquea la síntesis de ureidos por la expresión de un antisentido del gen de la uricasa, las plantas muestran síntomas de déficit de nitrógeno (Lee et al. 1993). Estos resultados indican que la fijación de  $N_2$  se inhibe bajo condiciones donde la síntesis de ureidos está restringida (Smith y Atkins 2002). La manipulación genética de los genes que codifican las enzimas de la ruta de síntesis *de novo* de las purinas parece ser la herramienta más idónea para analizar la función y regulación de éstos genes en plantas (Boldt y Zrenner 2003). La biosíntesis de purinas se localiza principalmente en las células infectadas del nódulo, y dentro de ellas en los plastidios y en las mitocondrias (Smith y Atkins 2002).

#### 4.2.- Transformación de IMP a ureidos.

Las purinas sintetizadas *de novo* se oxidan para dar lugar a los ureidos (Figura 6). La enzima IMP deshidrogenasa (EC 1.1.1.205) es la enzima que oxida el IMP a XMP. No está claro si esta enzima está localizada en las células infectadas o en las no infectadas, en el plastidio o en el citoplasma. El análisis de la secuencia del gen que la codifica sugiere una localización citosólica. Este gen se expresa específicamente en el nódulo y la actividad de la proteína está regulada por ciertos factores relacionados con la fijación del nitrógeno (Cao y Schubert 2001). Mediante la acción de una 5'-nucleotidasa y 3'-nucleosidasa, el XMP producido en el paso anterior se transforma en xantina. El IMP puede ser transformado a hipoxantina por la intervención de las enzimas 5'-nucleotidasa y 3'-nucleosidasa en una ruta independiente de IMP deshidrogenasa, aunque esta ruta parece no ser la vía principal de síntesis de ureidos en los nódulos.

La actividad 5'-nucleotidasa cataliza la hidrólisis del grupo fosfato de los nucleótidos monofosfato. En los nódulos de las leguminosas ureídicas en condiciones de fijación, esta actividad intervendría en la síntesis de ureidos a través de la desfosforilación de XMP a xantosina, mientras que en otros tejidos la actividad nucleotidasa podría actuar sobre los distintos nucleótidos monofosfato interviniendo en el reciclaje de purinas (Figura 6). Esta enzima está mucho más caracterizada en vertebrados y bacterias. En mamíferos se ha descrito una familia constituida de siete proteínas distintas con diferentes localizaciones subcelulares y con muy baja similitud entre sus secuencias (Bianchi y Spsychala 2003). Las 5'-nucleotidasas forman parte de la superfamilia de las "haloacid dehalogenase-like" hidrolasas (HAD), que incluye fosfoesterasas, ATPasas, fosfonatasas, deshalogenasas y azúcar fosfomutasas actuando sobre gran diversidad de sustratos (Burroughs et al. 2006). El grupo de las nucleotidasas es diverso, presentando actividad frente a un amplio número de nucleótidos con diferente especificidad. En mamíferos, se ha descrito una actividad específica de nucleótidos monofosfato purínicos (cN-II) y otra

actividad específica para nucleótidos monofosfato pirimidínicos (cN-III) (Bianchi y Spychala 2003). En plantas, se han descrito y purificado varias actividades clasificadas como nucleotidasas en cotiledones de judía (Lai et al.



**Figura 6. Síntesis de novo de ureidos en leguminosas ureídicas.** La vía principal de síntesis de los ureidos aparece destacada con trazo más grueso. (1), IMP deshidrogenasa; (2), 5'nucleotidasa; (3), 3'nucleosidasa; (4), adenosina desaminasa; (5), guanina desaminasa; (6), xantina deshidrogenasa; (7), xantina oxidasa; (8), urato oxidasa; (9), hidroxisourato hidrolasa; (10), OHCU descarboxilasa; (11), alantoinasa; (12), alantoína sintasa.

1971), de *Arachis hipogaea* (Mittal et al. 1988; Gupta y Sharma 1996) y en nódulos de soja (Ostergaard et al. 1991). También en cotiledones de *Arachis hipogaea* se han purificado dos nucleotidasas, una de Golgi y otra de membrana plasmática, y con alta especificidad frente a nucleótidos monofosfato de purinas (Gupta y Sharma 1996).

La actividad 3'-nucleosidasa cataliza la hidrólisis del nucleósido produciendo la liberación de la base nitrogenada y la ribosa. Esta actividad se ha descrito en *E. coli* (Hunt et al. 2005) y *Saccharomyces cerevisiae* (Kurtz et al. 2002) pero no en mamíferos, donde se ha descrito una actividad nucleósido fosforilasa que produce una base y una ribosa fosfato (Parkin et al. 1991). En plantas, la actividad 3'-nucleosidasa se demostró en discos de patata (Katahira y Ashihara 2002, 2006) y se purificó y caracterizó la actividad en hojas jóvenes de *Coffea arabica* (Campos et al. 2005) y *Lupinus luteus* (Szuwart et al. 2006). La secuenciación del genoma de *Arabidopsis* permitió la identificación de dos genes (*URH1* y *URH2*) relacionados con la actividad nucleosidasa. El producto del gen *URH1* se purificó mostrando actividad en orden descendiente frente a los sustratos uridina, inosina y adenosina (Jung et al. 2009). Recientemente, un estudio realizado con plantas de *Arabidopsis* mutantes para los genes *URH1* y *URH2* ha revelado la necesidad de ambas actividades para la hidrólisis de inosina y xantosina (Riegler et al. 2011).

La siguiente enzima de la ruta es la xantina deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico, generándose en ambos casos poder reductor. Esta enzima se encuentra en el citosol de las células infectadas y no infectadas (Datta et al. 1991). A continuación, la enzima uricasa o urato oxidasa (EC 1.7.3.3) cataliza la oxidación del urato a 5-hidroxiisourato usando  $\text{O}_2$  como aceptor de electrones (Kahn et al. 1997). Esta enzima se ha encontrado en los peroxisomas de las células no infectadas del nódulo. El 5-hidroxiisourato (HIU) tiene una vida media a pH neutro del orden de 30 minutos y se transforma en alantoína



espontánea o enzimáticamente (Kahn y Tipton 1998).

A partir de nódulos de soja se purificó una actividad enzimática que cataliza la degradación de HIU a 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina (OHCU), la hidroxisourato hidrolasa (Sarma et al. 1999), y se clonó el gen que la codifica (Raychaudhuri y Tipton 2002). La descarboxilación espontánea del OHCU formaría una mezcla racémica de alantoína, mientras que el producto de la degradación del urato *in vivo* es la S-alantoína (Vogels y Van der Drift 1976), lo que indica que la descarboxilación del OHCU debe estar catalizada por una enzima. En soja se ha identificado un gen con los dominios y centros activos para HIU hidrolasa y OHCU descarboxilasa (Ramazzina et al. 2006). La expresión de este gen genera una proteína funcional con ambas actividades enzimáticas y que se ha denominado alantoína sintasa (Pessoa et al. 2010). Por lo tanto, en soja se han descrito dos enzimas distintas que catalizan la hidrólisis de HIU: la hidroxisourato hidrolasa que es específica de nódulos y la alantoína sintasa. Esta última se localiza en el peroxisoma y en el citoplasma debido a un procesado diferencial del ARNm mediante el cual se elimina la señal de localización en el peroxisoma presente en el gen. La alantoína sintasa de *Arabidopsis* está formada posiblemente por cuatro subunidades unidas de dos en dos con dos dominios activos HIU hidrolasa y cuatro dominios activos OHCU descarboxilasa (Werner y Witte 2011). El producto de la reacción, la alantoína, se transportaría hasta el retículo endoplásmico (RE) mediante un transportador transmembrana de alantoína identificado en *Phaseolus vulgaris* (Pelissier et al. 2004) y en *Arabidopsis thaliana* (Desimone et al. 2002), aunque aún hay dudas sobre si la alantoína es el sustrato fisiológico del transportador (Schmidt et al. 2004).

La alantoínasa o alantoína amidohidrolasa (EC 3.5.2.5) es la enzima responsable de catalizar la hidrólisis del enlace amido interno de la alantoína para producir alantoato (Schubert y Boland 1990). Esta enzima cataliza el paso final de la ruta de síntesis de ureidos en los tejidos que exportan alantoato y, a su

vez, es la primera enzima de la ruta de degradación de ureidos en los que importan alantoína. Esta enzima se tratará con más detalle en el siguiente apartado.

## 5.- CATABOLISMO DE UREIDOS

La degradación de los ureidos implica su conversión en glioxilato y urea o amonio (Figura 7). La alantoinasa cataliza la degradación de la alantoína en alantoato. Esta enzima se ha caracterizado en frutos de judía (Raso et al. 2007b), y en semillas (Webb y Lindell 1993), cotiledones y nódulos de soja (Bell y Webb 1995), siendo aún limitado el conocimiento sobre el significado fisiológico de esta enzima en el crecimiento y desarrollo de la planta (Yang y Han 2004). En judía se encontraron dos isoformas con distinta abundancia relativa en diversos tejidos y con propiedades muy similares (Raso et al. 2007b). En soja también se ha descrito múltiples formas de la actividad alantoinasa en cotiledones y nódulos (Bell y Webb 1995). Estos mismos autores descubrieron que las proteínas purificadas a partir de nódulos y semillas de soja tenían secuencias aminoacídicas diferentes. La presencia de varias proteínas con actividad alantoinasa también se ha descrito en animales, así tanto en *Rana catesbeiana* (Masuda et al. 2001) como en *C. felis* (Gaines et al. 2004) se han encontrado dos proteínas con actividad alantoinasa en extractos de un mismo tejido.

El ADNc que codifica la alantoinasa de plantas se aisló por primera vez a partir de la leguminosa amídica *Robinia pseudoacacia* y *Arabidopsis* (Yang y Han 2004). Con anterioridad, se había clonado el gen que codifica la alantoinasa en bacterias como *E. coli* (Cusa et al. 1999), en levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* (Buckholz y Cooper 1991), y en animales, como *Rana catesbeiana* (Hayashi et al. 1994) o *Ctenocephalides felis* (Gaines et al. 2004). En judía, se clonó un ADNc que codifica la actividad alantoinasa (Raso 2008) y que recientemente se ha depositado en el banco de datos NCBI con el código

JQ282796 (*ALN1*) (Piedras, Raso, Quiles y Pineda) junto con un segundo ADNc, muy similar al anterior, con el código JQ277455 (*ALN2*) (Alamillo, Galvez-Valdivieso, Diaz-Leal, Coletto, Robles y Pineda). En *Arabidopsis*, la proteína alantoinasa se localiza en el retículo endoplásmico al igual que la

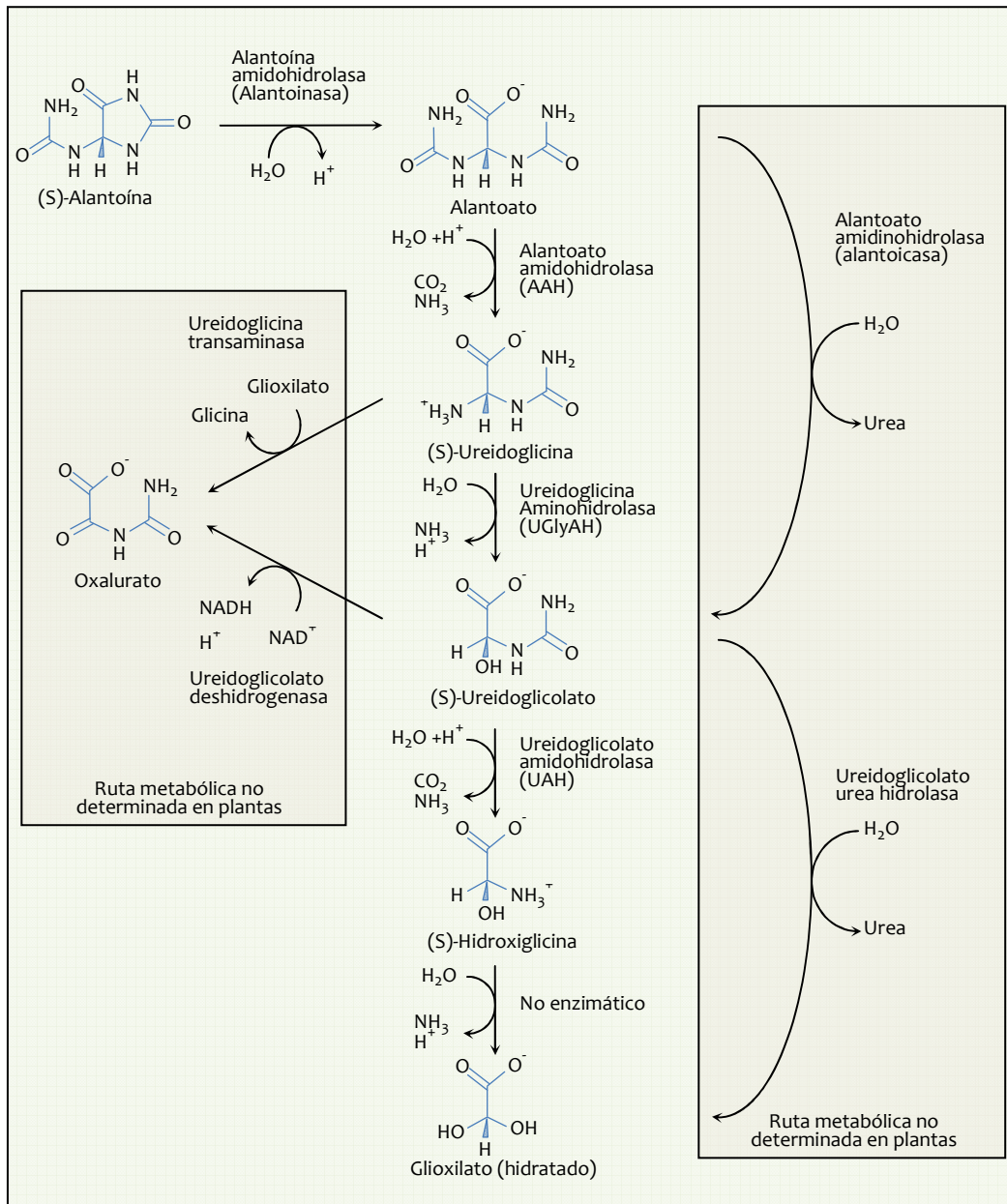


Figura 7. Rutas degradadoras de Ureidos. Adaptado de Werner y Witte (2011).

proteína resultante de expresar de forma transitoria el gen de la alantoinasa de soja en plantas de tabaco (Werner et al. 2008). En judía, se ha demostrado que se producen cambios importantes en los niveles de ureidos durante el desarrollo que se correlacionan con los cambios en la regulación de la alantoinasa (Diaz-Leal et al. 2012)

El producto de la reacción catalizada por la alantoinasa es el ácido alantoico. Los estudios realizados en otros organismos indican que la degradación del alantoato puede ocurrir por dos rutas diferentes, a través de la alantoato amidohidrolasa (EC 3.5.3.9), que libera  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_4^+$ , o a través de la alantoicasa o alantoato amidinohidrolasa (EC 3.5.3.4), que produce urea (Figura 7). La actividad alantoato amidohidrolasa se ha descrito en *Arabidopsis*, soja y judía (Todd y Polacco 2006; Raso et al. 2007a; Werner et al. 2008). La actividad alantoicasa en organismos fotosintéticos solo se ha descrito en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Piedras et al. 2000). Recientemente se ha comprobado que el producto de la reacción de la actividad alantoato amidohidrolasa es ureidoglicina, dióxido de carbono y una molécula de amonio (Serventi et al. 2010; Werner et al. 2010).

La ureidoglicina es un compuesto muy inestable que se transforma de forma espontánea en ureidoglicolato y por tanto este paso de la ruta podría ser espontáneo o estar catalizado enzimáticamente (Schubert y Boland 1990; Todd y Polacco 2006). Recientemente, se ha identificado un gen en *Arabidopsis* que codifica una actividad ureidoglicina amidohidrolasa que cataliza esta reacción. Este gen se ha expresado y la proteína que codifica se ha purificado obteniéndose una actividad que hidroliza S-ureidoglicina para dar S-ureidoglicolato y amonio (Serventi et al. 2010; Werner et al. 2010).

El S-ureidoglicolato también es un compuesto relativamente inestable que se transforma en glioxilato y urea de forma espontánea. La degradación enzimática de este compuesto hasta glioxilato puede estar catalizada por varias actividades enzimáticas: la ureidoglicolato amidohidrolasa (EC 3.5.3.19), que

libera  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CO}_2$  y glioxilato; y la ureidoglicolato urea-liasa (EC 4.3.2.3), que libera urea y glioxilato (Figura 7). Ha habido controversia sobre la actividad implicada en la degradación de ureidoglicolato en plantas (Todd et al. 2006). La actividad ureidoglicolato amidohidrolasa fue primeramente identificada en la testa de frutos en desarrollo de soja y se sugirió que podía formar parte de un complejo enzimático con la alantoato amidohidrolasa (Winkler et al. 1988). Sin embargo, se ha propuesto que la ureidoglicolato urea-liasa es la enzima implicada en la degradación del ureidoglicolato en soja (Todd y Polacco 2004), garbanzo (Muñoz et al. 2001) y judía (Muñoz et al. 2006). La estructura cristalina de la ureidoglicolato amidohidrolasa se ha determinado para la proteína purificada a partir de *Escherichia coli* (Raymond et al. 2005). El gen que codifica esta enzima se ha identificado en *Arabidopsis* y su expresión ha permitido purificar la proteína que codifica, comprobándose que cataliza la degradación de S-ureidoglicolato a glioxilato,  $\text{CO}_2$  y dos moléculas de  $\text{NH}_4^+$  (Werner et al. 2010).

Un aspecto importante del metabolismo de ureidos en leguminosas es la dependencia de la fenilhidrazina. Las actividades ureidoglicolasa de garbanzo y judía requieren de fenilhidrazina en el ensayo (Wells y Lees 1991; Muñoz et al. 2001; Muñoz et al. 2006). Recientemente, se ha demostrado que la fenilhidrazina actúa como sustrato en las enzimas purificadas de judía y garbanzo, y que el producto de ambas enzimas es ureidoglicolil fenilhidrazida y no glioxilato (Muñoz et al. 2011). El producto formado se descompone no enzimáticamente en fenilhidrazona de glioxilato y urea, lo que explica la clasificación de ambas como urea-liasas (Muñoz et al. 2011). La fenilhidrazina no se presenta como sustrato natural salvo en ciertos hongos (Levenberg 1964), por lo que se propone la existencia de un compuesto análogo a ésta como verdadero sustrato para la enzima *in vivo* (Muñoz et al. 2011). De forma similar, la actividad que cataliza la degradación de alantoato descrita en judía mostró una regulación mediada por fenilhidrazina (Raso et al. 2007a). Estos datos llevan a

pensar que en plantas podrían existir dos rutas distintas de degradación de ureidos, una implicada en el aprovechamiento del nitrógeno presente en las purinas de la propia célula y otra especializada en el metabolismo de ureidos en tejidos donde estos compuestos se utilizan de forma mayoritaria como transporte de nitrógeno desde otros tejidos (Muñoz et al. 2011).

**6.-OBJETIVOS.**

El objetivo general de este trabajo ha sido dilucidar el papel del metabolismo de ureidos en la germinación y el crecimiento post-germinativo de una leguminosa ureídica como es *Phaseolus vulgaris*. Esto se abordará mediante los siguientes objetivos o hitos concretos:

- 1.-Determinación de los niveles de ureidos y de las actividades que catalizan su degradación durante la germinación y desarrollo post-germinativo de varias leguminosas.
- 2.-Determinación de la actividad alantoinasa en plántulas de *Phaseolus vulgaris* desarrolladas en varias condiciones ambientales.
- 3.-Sobreexpresión el gen *ALNI* (JQ282796), obtención de anticuerpos policlonales frente a proteína alantoinasa recombinante y análisis de la expresión de la alantoinasa en judía mediante western.
- 4.-Identificación de las actividades fosfatasas implicadas en la degradación de nucleótidos de purinas durante la germinación.
- 5.-Clonación del gen que codifica una posible nucleotidasa de judía.

## **II.- MATERIALES Y MÉTODOS**





**1.- REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS.**

Todos los productos y reactivos fueron de alta calidad o grado analítico y se adquirieron en las casas comerciales indicadas entre paréntesis.

Acetato potásico (Sigma-Aldrich)

Acetato sódico (Sigma-Aldrich)

Acetato amónico (Sigma-Aldrich)

Ácido acético glacial (Panreac)

Ácido clorhídrico (Panreac)

Ácido etilen-diamino-tetraacético, sal disódica (EDTA-Na<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich)

Ácido glioxílico monohidrato (Sigma-Aldrich)

Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) (Sigma-Aldrich)

Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich)

Ácido N-tris (hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico (TES) (Sigma-Aldrich)

Ácido sulfúrico (Merck)

Ácido tricloroacético (Panreac)

Acrilamida / Bis-acrilamida 30% (Bio-Rad)

ADN del fago  $\lambda$  digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas)

ADN polimerasa *Taq* (Biotools)

Advantage *Taq* Polimerasa (Clontech)

Agar (Panreac)

Agarosa (Biotools)

Alantoato potásico (Sigma-Aldrich)

Alantoína (Sigma-Aldrich)

Alopurinol (Sigma-Aldrich)

Adenosina monofosfato (AMP) (Sigma-Aldrich)

Ampicilina, sal sódica (Sigma-Aldrich)

Arena de mar lavada (Panreac)

Azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich)

Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)  
Bacto-triptona (Difco)  
5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal) (Sigma-Aldrich)  
Bromuro de 2,7-diamino-10-etil-9-fenilfenantridio (Bromuro de etidio) (Sigma-Aldrich)  
Carbonato sódico (Sigma-Aldrich)  
Citrato trisódico dihidrato (Panreac)  
Cloroformo (Merck)  
Cloruro amónico (Panreac)  
Cloruro cálcico dihidrato (Sigma-Aldrich)  
Cloruro de magnesio tetrahidrato (Sigma-Aldrich)  
Cloruro potásico (Merck)  
Cloruro sódico (Panreac)  
Citosina monofosfato (CMP) (Sigma-Aldrich)  
Desoxicolato sódico (DOC) (Sigma-Aldrich)  
N-N-Dimetilformamida (Merck)  
2,4-Dinitrofenilhidrazina (solución en ácido fosfórico) (Fluka)  
Ditiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich)  
Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Biotools)  
Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma-Aldrich)  
Endonucleasas de restricción: *NcoI*, *BanHI*, *Sall*, *XhoI* (MBI-Fermentas)  
Etanol absoluto (Merck)  
Europerl<sup>®</sup> Perlita expandida (Europerlita Española S.A.)  
Extracto de levadura (Panreac)  
Fenilhidrazina clorhidrato (Sigma-Aldrich)  
Fenol (Merck)  
Ferricianuro potásico (Sigma-Aldrich)  
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich)  
Formaldehído 37% (Merck)

Fosfato potásico mono y dibásico (Panreac)  
Fosfato sódico monobásico dihidrato (Panreac)  
Fosfato sódico dibásico (Panreac)  
Glicina para electroforesis (Sigma-Aldrich)  
Glucosa (Panreac)  
Guanosina monofosfato (GMP) (Sigma-Aldrich)  
Hidrazina sulfato (Sigma-Aldrich)  
Hidróxido sódico (Panreac)  
Hidróxido potásico (Panreac)  
Hipoclorito sódico 10% (p/v) (Panreac)  
Inosina monofosfato (IMP) (Sigma-Aldrich)  
Isopropanol (Merck)  
Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG) (Pharmacia)  
Marcador de tamaño 100 bp DNA Ladder (Biotools)  
Marcadores de masas moleculares para SDS-PAGE (30-200 kDa) (Sigma-Aldrich)  
Marcadores de masas moleculares preteñidos para SDS-PAGE (7-200 kDa) (Bio-Rad)  
Marcadores de masas moleculares preteñidos para SDS-PAGE (10-170 kDa) (Fermentas)  
 $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)  
Metanol de grado HPLC (Panreac)  
Molibdato disódico dihidrato (Panreac)  
Molibdato amónico tetrahidrato (Panreac)  
Nitrato potásico (Merck)  
Nitrato de plata (Sigma-Aldrich)  
Nitroprusiato sódico (Panreac)  
Ovoalbúmina (Sigma-Aldrich)  
Polivinilideno de difluorido (PVDF) (Sigma-Aldrich)

Reactivo de Bradford (Bio-Rad)  
Sandofer<sup>®</sup> (quelato de Fe) (Syngenta)  
Seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich)  
Sulfato amónico (Panreac)  
Sulfato de magnesio heptahidrato (Panreac)  
TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina) (Sigma-Aldrich)  
Transcriptasa inversa Power Script<sup>™</sup> (Clontech)  
Trietanolamina (TEA) (Sigma-Aldrich)  
TRI REAGENT<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich)  
Trizma Base [tris(hidroximetil)aminometano] (TRIS) (Sigma-Aldrich)  
Tween 20 (Sigma-Aldrich)  
Urea (Merck)  
Ureasa de *Canavalia ensiformis* tipo III (Sigma-Aldrich)  
Ureidoglicolato sódico (Sigma-Aldrich)  
Uridina monofosfato (UMP) (Sigma-Aldrich)  
Xantina monofosfato (XMP) (Sigma-Aldrich)  
Xilen-cianol FF 0,25% (p/v) (Sigma-Aldrich)

El proceso de autoclave o esterilización consistió en someter el material o solución durante 20 min a 126 °C.

## **2.- MATERIAL VEGETAL**

Las semillas de judía (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Great Northern) y garbanzo (*Cicer arietinum* L. cv. Faldon) fueron suministradas por la empresa Eurosemillas S.A. (Córdoba, España); el resto de semillas se obtuvieron de mercados locales.

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente mediante el siguiente procedimiento: un lavado en etanol absoluto durante 30 s, seguido de un baño en solución de hipoclorito sódico al 0,2% (p/v) durante 10 min y 6 lavados en agua

desionizada estéril para eliminar la solución anterior. Las semillas esterilizadas se colocaron en placas de petri de 120 mm de diámetro sobre 4 láminas de papel de filtro. Una quinta lámina se colocó cubriendo las semillas. El conjunto se humedeció con 10 ml de la solución correspondiente, manteniéndose la humedad por adición regular de solución. El número de semillas en cada placa nunca fue superior a 10. Las placas se colocaron en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz (26 °C) y 8 horas de oscuridad (20 °C). En todo el proceso se mantuvieron las condiciones de esterilidad.

### **3.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES**

Se utilizó material fresco recogido directamente de la cámara de cultivo. Salvo que se indique lo contrario, el procedimiento fue el siguiente. El material se trituró a 4 °C en un mortero con arena de mar lavada tras añadir tampón de extracción en una relación de 4 ml g<sup>-1</sup> de peso fresco. Para las determinaciones de actividades que catalizan la degradación de alantoato y ureidoglicolato se utilizó como tampón de extracción TEA-NaOH 50 mM (pH 7,8) que contenía 1 mM de MnSO<sub>4</sub> y 0,1% (p/v) de DOC. Para el resto de determinaciones se utilizó como tampón de extracción TRIS-ClH 50 mM (pH 7,8) que contenía 1 mM de MnSO<sub>4</sub> y 0,1% (p/v) de DOC. La suspensión homogénea obtenida se incubó en hielo durante 15 min. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12.100 g y el sobrenadante resultante se empleó directamente para la determinación de las actividades que catalizan la degradación de alantoato y de ureidoglicolato, o se almacenó a -20 °C para el resto de las determinaciones.

### **4.- DETERMINACIÓN DE METABOLITOS**

#### **4.1.- Determinación de proteína soluble.**

La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo con reactivo de Bio-Rad basado en el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina

bovina como patrón. En el caso de los perfiles de las cromatografías, la concentración de proteína se estimó mediante la absorbancia a 280 nm.

#### **4.2.- Determinación de amonio y de urea.**

El amonio se determinó mediante el método espectrofotométrico utilizado por Witte y Medina-Escobar (2001). Una cantidad adecuada de muestra se mezcló con H<sub>2</sub>O desionizada hasta un volumen de 1 ml. Sobre esta mezcla se añadieron 0,1 ml de la solución A y 0,2 ml de la solución B, cerrándose inmediatamente los tubos para evitar pérdidas de amonio. Los tubos se agitaron y se colocaron en un baño de agua o termobloque a 50 °C durante 30 min. A continuación, se determinó la absorbancia a 636 nm. La recta de calibrado se realizó con NH<sub>4</sub>Cl como patrón y se obtuvo un coeficiente de extinción milimolar de 19,01 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

La concentración de urea presente en los extractos se determinó mediante la transformación de ésta a amonio utilizando ureasa comercial en extractos desproteinizados. Estos extractos se obtuvieron utilizando dispositivos de diálisis NANOSEP (Pall Corporation) con un rango de poro de 10 kDa. La mezcla de reacción para la transformación de urea a amonio estaba compuesta de: tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM (pH 7), 2,4 U de ureasa y el volumen adecuado de extracto en un volumen final de 0,25 ml. Esta mezcla se incubó a 50 °C durante 35 min y a continuación se añadieron 0,75 ml de agua desionizada fría. La concentración de amonio se determinó inmediatamente como se ha descrito anteriormente. La concentración de urea se calculó tras restar la cantidad de amonio presente en el extracto.

#### **Reactivos**

##### **Solución A (100 ml):**

**En 70 ml de H<sub>2</sub>O desionizada se disolvieron, por este orden, 7 g de fenol y 39 mg de nitroprusiato sódico. Se ajustó el volumen a 100 ml y se almacenó en oscuridad a 4 °C**

**Solución B (200 ml):**

Se disolvieron 2,96 g de NaOH y 11,79 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 140 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada. A continuación se añadieron 19,92 ml de solución de NaClO al 10%. El pH de la solución se ajustó con NaOH hasta 12,0 y el volumen a 200 ml con agua desionizada. La solución se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente

**4.3.- Determinación de ureidos (alantoína, alantoato y ureidoglicolato) y glioxilato en extractos.**

El contenido de ureidos de los extractos se determinó mediante el procedimiento descrito por Vogels y Van der Drift (1970). En este método los ureidos se transforman químicamente en glioxilato. La determinación estándar del glioxilato se realizó para un volumen de muestra de 1 ml; por tanto, una cantidad adecuada de extracto se llevó hasta 1 ml de volumen con agua. Sobre esta mezcla se añadieron 0,2 ml de tampón fosfato sódico 0,4 M (pH 7,0) y 0,2 ml de fenilhidrazina-HCl 22,8 mM (0,33%, p/v) para formar la fenilhidrazona del glioxilato. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, se le añadió 1 ml de HCl 12 N a 4 °C y 0,2 ml de ferricianuro potásico 48,6 mM (1,6%, p/v). Después de 15 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 520 nm. El coeficiente de extinción milimolar del producto final (difetilformazán del glioxilato) fue de  $42,36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

El alantoato presente en los extractos se determinó tras su transformación a glioxilato. A una cantidad adecuada de extracto se le añadió agua destilada hasta un volumen de 0,8 ml. Se añadieron 0,2 ml de HCl 0,15 N y la mezcla se incubó a 100 °C durante 10 min, transformándose así el alantoato presente en glioxilato. Tras enfriar las muestras en un baño a 4 °C se determinó el glioxilato mediante el análisis estándar descrito anteriormente.

Para la determinación de la concentración de alantoína se mezcló una cantidad adecuada de extracto con agua destilada hasta un volumen de 0,6 ml. Se añadieron 0,2 ml de NaOH 0,5 M y la mezcla se incubó a 100 °C durante 10 min para transformar la alantoína en alantoato. Tras enfriar en un baño a 4 °C, se



le añadieron 0,2 ml de HCl 0,65 N y la mezcla se incubó de nuevo durante 10 min a 100 °C para transformar el alantoato a glioxilato. Después de enfriar, se determinó el glioxilato mediante el análisis estándar descrito anteriormente.

Para la determinación de la concentración de ureidoglicolato, se mezcló un volumen adecuado de la muestra con 0,2 ml de tampón fosfato 0,4 M (pH 7,0) y agua desionizada hasta un volumen de 1,2 ml. Esta mezcla se incubó durante 10 min a 100 °C para transformar el ureidoglicolato en glioxilato. A continuación, se enfrió en un baño a 4 °C y se añadieron 0,2 ml de fenilhidrazina-HCl al 0,33% (p/v) y se continuó con el protocolo descrito anteriormente para la determinación de glioxilato.

#### **4.4.- Determinación de aminoácidos en extractos.**

La cantidad de aminoácidos solubles se determinó por el método de la ninhidrina descrito por Yemm y Cocking (1955). Una cantidad adecuada de extracto se diluyó hasta un volumen de 1 ml con agua y se le añadieron 0,5 ml de tampón citrato 0,2 M pH 5,0. Posteriormente se añadieron 0,2 ml de la solución I y 1 ml de la solución II. Tras agitar para mezclar, se calentaron las muestras a 100 °C durante 15 min. Se enfriaron en agua corriente y se añadió etanol al 60% (v/v) hasta un volumen final de 5 ml, se agitaron y se determinó la absorbancia de las muestras a 570 nm. El coeficiente de extinción milimolar a 570 nm fue de  $21,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

##### **Reactivos**

##### **Solución I:**

**Ninhidrina al 5% (p/v) en metilcelosolve (2-metoxietanol)**

##### **Solución II:**

**Cianuro potásico 10 mM diluido 50 veces con metilcelosolve (2-metoxietanol)**

#### **4.5.- Determinación de globulinas.**

Las globulinas 7S presentes en las plántulas de judía se extrajeron siguiendo el protocolo descrito en Carbonaro (2006) con pequeñas modificaciones. Los tejidos se homogeneizaron en mortero a 4 °C en tampón A, en una relación de 4 ml por g de peso fresco para los ejes y de 10 ml por g de peso fresco para los cotiledones. Tras centrifugar durante 10 min a 12.100 g se tomaron partes alícuotas de los extractos y se les añadió HCl para alcanzar una concentración final de 95 mM. Los extractos se centrifugaron de nuevo durante 10 min a 12.100 g y a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y los precipitados se resuspendieron en tampón B, en un volumen igual al inicial. Estos extractos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

##### **Reactivos**

##### **Tampón A:**

TRIS-HCl 0,15 M pH 8,5

##### **Tampón B:**

TRIS-HCl 0,025 M pH 8,5

#### **5.- ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1  $\mu$ mol de producto por min en las condiciones del ensayo.

##### **5.1.- Determinación de la actividad alantoinasa.**

Para la determinación de actividad alantoinasa se siguió la formación de alantoato, como se indicó en Raso et al. (2007b). La mezcla de reacción consistió en: TRIS-HCl 50 mM (pH 7,8), MnSO<sub>4</sub> 1 mM, alantoína 12 mM y una cantidad adecuada de extracto. La reacción se inició por adición del sustrato y se llevó a cabo a 35 °C. A distintos tiempos, se tomaron partes alícuotas de 0,2 ml

de la mezcla de reacción que se pusieron en tubos que contenían 0,2 ml de HCl 0,15 N y 0,6 ml de agua. A continuación se determinó la concentración de alantoato como se ha descrito en el apartado 4.3. En todos los casos se realizaron controles para determinar la producción no enzimática de alantoato.

### **5.2.- Determinación de la actividad que cataliza la degradación del alantoato.**

La actividad que cataliza la degradación del alantoato se determinó mediante la cuantificación del ureidoglicolato como se ha descrito por Raso et al. (2007a), con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción consistió en: TEA-NaOH 50 mM (pH 7,0), MnSO<sub>4</sub> 1 mM, alantoato potásico 12 mM, fenilhidrazina-HCl 0,70 mM (0,01%, p/v) y una cantidad adecuada de extracto. Las mezclas se incubaron a 35 °C y a diversos tiempos se tomaron partes alícuotas de 0,3 ml que se añadieron a tubos que contenían 0,2 ml de TEA-NaOH 150 mM (pH 7,8) a 4 °C. Las muestras se incubaron durante 10 min a 100 °C para la transformación del ureidoglicolato en glioxilato. Tras enfriar durante 5 min en agua a 4 °C se añadieron 0,1 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina 5 mM (disuelta en HCl 2 N) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 1,4 ml de tampón fosfato sódico 0,6 M (pH 12,0) y tras 20 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia de la solución a 450 nm. En todos los casos se realizaron controles para determinar la liberación no enzimática de ureidoglicolato. El coeficiente de extinción milimolar a 450 nm fue de 14,12 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### **5.3.- Determinación de la actividad que cataliza la degradación del ureidoglicolato.**

Esta actividad se determinó como se indicó por Muñoz et al. (2006). La mezcla de reacción fue la siguiente: TES-NaOH 50 mM (pH 7,8), MnSO<sub>4</sub> 0,5 mM, fenilhidrazina-HCl 10,4 mM (0,15%, p/v), ureidoglicolato sódico 2,5 mM, y una

cantidad adecuada de extracto. La reacción se inició por adición del sustrato y se llevó a cabo a 30 °C. A distintos tiempos, se extrajeron partes alícuotas de 0,4 ml de la mezcla de reacción que se añadieron a tubos que contenían 0,8 ml de agua desionizada y 0,2 ml de tampón fosfato 0,4 M a 4 °C. Transcurridos 5 min, se les añadió 1 ml de HCl 12 N, 0,2 ml de ferricianuro potásico 48,6 mM (1,6%, p/v) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se determinó la absorbancia a 520 nm. En todos los casos se realizaron controles para determinar la liberación no enzimática de glioxilato.

#### **5.4.- Determinación de la actividad fosfatasa con nucleótidos.**

##### 5.4.1.- Determinación colorimétrica.

La determinación de esta actividad se realizó de forma rutinaria siguiendo la producción de fosfato inorgánico en la mezcla de reacción según el método descrito por Katewa y Katyare (2003), con pequeñas variaciones. La mezcla de reacción para la determinación de actividad fosfatasa resistente a molibdato estuvo formada por MES-NaOH 50 mM (pH 5,5), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 5 mM, el nucleótido correspondiente a una concentración de 5 mM y la cantidad adecuada de extracto. Para el ensayo de las actividades fosfatasas totales se eliminó el Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> de la mezcla de reacción. En ambos casos, las reacciones se iniciaron por la adición del sustrato y se llevaron a cabo a 37 °C. A diferentes tiempos se recogieron partes alícuotas de las mezclas de reacción que se pusieron en tubos y se ajustaron los volúmenes a 0,6 ml con agua. A continuación se añadieron 0,2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N, 0,1 ml de solución M y 0,1 ml de solución R. Las mezclas se agitaron y, tras 50 min a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 820 nm. En todos los casos se realizaron controles para determinar la liberación no enzimática de fosfato.

La determinación de la actividad fosfatasa en los extractos obtenidos a partir de *E. coli* se llevó a cabo en la mezcla de reacción compuesta de TRIS-HCl 50 mM (pH 7,8), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, el nucleótido correspondiente

a una concentración de 5 mM y la cantidad adecuada de extracto. La determinación de fosfato se realizó como se ha descrito en el párrafo anterior.

**Reactivos****Solución M:**

**Molibdato amónico 2,5% (p/v) disuelto en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N**

**Solución R:**

**ácido L-ascórbico 2% (p/v)**

**hidracina sulfato 2% (p/v)**

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N**

**5.4.2.- Determinación en geles de acrilamida.**

Los extractos se mezclaron con tampón de carga de Laemmli (1970) que carecía de β-mercaptoetanol y se cargaron directamente sin calentar en los geles de acrilamida al 7,5 o 10% preparados como se describe más adelante. La electroforesis se llevó a cabo a 30 mA y a 4 °C. Tras la electroforesis, el gel se sometió a dos lavados de 10 min cada uno con tampón MES-NaOH 50 mM (pH 5,5), para retirar el SDS, en agitación suave y a 4 °C. A continuación se sumergió en la mezcla de reacción compuesta por MES-NaOH 50 mM (pH 5,5) y 5 mM de nucleótido, en presencia o ausencia de 5 mM de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, y se realizó una incubación inicial de 10 min a 4 °C y en agitación leve, seguido de una final a 37 °C y sin agitación por un periodo de tiempo variable dependiendo de la actividad de los extractos. Se retiró la mezcla de reacción y el fosfato inorgánico liberado en el gel se determinó según el método descrito por Simonovic et al. (2004), que consiste en colocar los geles, tras lavar brevemente en agua desionizada, en la solución de revelado hasta que las bandas de actividad se hagan visibles. La reacción de revelado se detuvo lavando los geles con abundante agua, y los geles se fotografiaron frente a un fondo negro.

**Reactivos****Solución de revelado:**

1,06% (p/v) de amonio heptamolibdato tetrahidrato

9,2% (v/v) de HCl 12 N

1,37% (v/v) de trietilamina

**5.5.- Determinación de la actividad ureasa.**

La actividad ureasa se determinó siguiendo la aparición del producto de la reacción (amonio). La mezcla de reacción estaba compuesta de tampón TEA-NaOH 50 mM (pH 7,8), urea 37,5 mM y la cantidad adecuada de extracto. La reacción se inició por adición del sustrato y se incubó a 50 °C. Partes alícuotas de 0,2 ml de la mezcla de reacción se recogieron a diferentes tiempos y se añadieron a tubos que contenían 0,8 ml de H<sub>2</sub>O a 4 °C. A continuación se determinó la concentración de amonio como se ha descrito en el apartado 4.2.

**6.- CULTIVOS BACTERIANOS****6.1.- Estirpes bacterianas.**

Se utilizaron dos cepas diferentes del organismo *Escherichia coli*. Para las tareas de clonación se utilizó la estirpe de DH5 $\alpha$  (*supE44*,  $\Delta$ *lacU169*, ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) y para las tareas de sobreexpresión se utilizó la estirpe BL21 (DE3) (*hsdS*, *gal* ( $\lambda$ cIts857, *ind-1*, *Sam7*, *nin-5*, *lacUV5-T7 gene 1*)).

**6.2.- Condiciones de cultivo.**

Ambas cepas se cultivaron a 37 °C a menos que se indique lo contrario. Los cultivos para el aislamiento de plásmidos se obtuvieron en agitación a 240 rpm durante unas 14 h, en un agitador orbital termostatzado y en recipientes de crecimiento con una cámara de aire de aproximadamente 4/5 partes del volumen total.

### **6.3.- Medios de cultivo.**

Los cultivos de *E. coli* se realizaron en medio LB (Luria-Bertani) esterilizado en autoclave. A los medios líquidos se les añadieron los suplementos una vez enfriados. A los medios sólidos se les añadió agar antes de autoclavar y los suplementos se añadieron tras autoclavar y enfriar a 50 °C, distribuyéndose posteriormente en placas de petri estériles de 8 cm de diámetro.

#### **Reactivos**

##### **Medio LB:**

**NaCl 170 mM**

**Bacto-triptona 10 g/l**

**Extracto de levadura 5 g/l**

**Para medios LB sólidos, se añadió agar al 1,5% (p/v)**

### **6.4.- Obtención de células competentes.**

La estirpe bacteriana se cultivó en medio LB en agitación a 240 rpm y 37 °C durante unas 14 h. Este cultivo se utilizó para inocular un volumen adecuado de LB fresco ( $V_i$ ) y se incubó a 37 °C en agitación hasta una  $DO_{600}$  aproximada de 0,5 (2 - 3 horas a 37 °C, 200 rpm). El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y a partir de ese momento todo el proceso se realizó a 4 °C. A continuación, las células se recogieron por centrifugación (2.800 g durante 5 min) y se resuspendieron en un volumen igual a  $1/2 V_i$  de  $CaCl_2$  50 mM estéril y frío (0 °C). Tras 30 min de incubación en hielo, se centrifugó a 2.800 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en  $1/10 V_i$  de  $CaCl_2$  50 mM frío (0 °C). Estas células competentes se mantuvieron en hielo entre 30 min y 24 horas antes de su transformación, o se almacenaron a -80 °C tras añadir glicerol a una concentración final del 10% (v/v).

### **6.5.- Transformación de células competentes.**

Se mezcló una parte alícuota de células competentes (100  $\mu$ l) con un volumen pequeño de solución de ADN plasmídico ( $\geq 3$  ng) y se incubó en hielo durante 30 min. Seguidamente, las células se sometieron a choque térmico a 42 °C durante 2 min e inmediatamente se enfriaron en hielo. A continuación, se añadieron 0,9 ml de medio SOC estéril y se incubó a 37 °C durante 60 min para reactivar el metabolismo celular. Una vez transcurrido este tiempo, las células se recogieron por centrifugación a 1.500 g durante 1 min y se resuspendieron en 150  $\mu$ l de medio SOC. Finalmente, las células se sembraron en placas de LB-agar suplementado según el plásmido utilizado.

#### **Reactivos**

##### **Medio SOC**

Se realizó por la mezcla a partes iguales de dos soluciones: solución I (NaCl 17,2 mM, bacto-triptona 40 g/l, extracto de levadura 10 g/l y KCl 5 mM) autoclavada, y solución II (glucosa 40mM y MgCl<sub>2</sub> 20 mM) esterilizada por filtración en poro de 0,2  $\mu$ m. El pH se ajustó a 7,0

## **7.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **7.1.- Aislamiento y purificación de ARN total de tejidos de *P. vulgaris*.**

Todo el material de plástico se esterilizó en autoclave por dos veces. El material vegetal (600 mg de tejido congelado a -80 °C) se trituró utilizando un mortero de porcelana hasta conseguir un polvo fino. Durante el proceso se evitó que se descongelase la muestra mediante la adición continua de N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, se homogeneizó mediante la adición de 3 ml de TRI REAGENT<sup>TM</sup> y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 0,6 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 2-15 min. A continuación, se centrifugó a 12.100 g durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa, que contenía el ARN, se pasó a otro tubo y se precipitó por adición



de 1,5 ml de isopropanol e incubación a temperatura ambiente durante 5-10 min. Se centrifugó de nuevo a 12.100 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado se lavó añadiendo 3 ml de etanol al 75% (v/v), agitando vigorosamente y centrifugando a 12.100 g durante 5 min a 4 °C. El precipitado final de ARN se dejó secar a temperatura ambiente, y se redisolvió en 0,1 ml de agua grado mili-Q estéril.

## **7.2.- Aislamiento de ADN plasmídico.**

Un volumen de 1,5 ml de cultivo de *E. coli* en fase exponencial (aproximadamente 12 h en agitación a 240 rpm y 37 °C) del transformante seleccionado se centrifugó a 2.800 g durante 2 min y a temperatura ambiente. Los plásmidos se aislaron a partir de estas células precipitadas siguiendo dos procedimientos.

### 7.2.1.- Utilización de Kit comercial.

Se empleó el kit comercial MINITOOLS Miniprep Extraction Kit (Biotools) utilizando las indicaciones del fabricante.

### 7.2.2.- Lisis alcalina y precipitación con iso-propanol.

Las células precipitadas se resuspendieron en 100 µl de solución I y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 µl de solución II y se mezcló suavemente por inversión del tubo cinco o seis veces. El homogeneizado resultante se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se añadieron 150 µl de solución III, previamente enfriada en hielo, se mezcló de nuevo suavemente por inversión del tubo y se incubó durante otros 5 min en hielo. La mezcla se centrifugó a 12.100 g durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se mezcló con 500 µl de iso-propanol utilizando un vórtex. Posteriormente, se centrifugó de nuevo durante 10 min a 12.100 g, se retiró la fase acuosa y el

precipitado se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de agua grado mili-Q estéril tras dejar evaporar los restos de iso-propanol.

#### **Reactivos**

##### **Solución I:**

**Glucosa 50 mM**

**TRIS-HCl 25 mM (pH 8,0)**

**EDTA- $\text{Na}_2$  10 mM**

##### **Solución II:**

**NaOH 0,2 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**

**$\text{H}_2\text{O}$ , 28,5 ml**

**La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato**

### **7.3.- Cuantificación de ácidos nucleicos.**

Los ácidos nucleicos se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo su absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que los coeficientes de extinción para el ADN bicatenario es de  $50 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$  y para el ARN de  $40 \mu\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{ml}$  (Sambrook et al. 1989). Paralelamente se determinó la absorbancia de las muestras a 230 nm y 280 nm, para determinar la presencia en las mismas de contaminantes de naturaleza glucídica y proteínica, respectivamente (cocientes  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} \leq 2$  y  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \leq 2$ , de forma respectiva). El ARN también se cuantificó mediante un espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Nucliber, España) mediante el programa *NanoDrop 3.0.0*.

Los ácidos nucleicos purificados también se cuantificaron mediante electroforesis por comparación de la intensidad de las bandas con un patrón de ADN de concentración conocida.

## **8.- ELECTROFORESIS**

### **8.1.- Electroforesis de ADN.**

La separación electroforética del ADN se llevó a cabo de forma horizontal empleando rutinariamente geles de agarosa en tampón TBE (1x) suplementado con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El porcentaje de agarosa en los geles osciló entre 0,7 y 2% (p/v), en función de los tamaños de los fragmentos que se deseaban separar. El ADN se cargó en el gel tras mezclar con un volumen adecuado de solución de carga. El tampón de electroforesis fue TBE (1x) y la separación se realizó a un voltaje comprendido entre 30 y 120 voltios (en función del tamaño de las moléculas y contenido en agarosa del gel), y durante un tiempo también variable e inversamente proporcional al voltaje empleado. En las electroforesis se incluyeron patrones para estimar la cantidad y tamaño de las moléculas de ADN presentes. La visualización de las moléculas de ADN se realizó tras exposición del gel a luz ultravioleta en un trans-iluminador.

#### **Reactivos**

##### **Marcadores:**

**500 ng de ADN del fago λ digerido con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (MBI-Fermentas)**

**500 ng del marcador de masa molecular 100 bp Ladder (Biotools)**

##### **Tampón TBE:**

**TRIS-HCl 90 mM (pH 8,0) que contenía H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 90 mM y EDTA-Na<sub>4</sub> 2 mM**

##### **Solución de carga para electroforesis de ácidos nucleicos (6x):**

**TRIS-HCl 10 mM pH 7,6**

**Azul de bromofenol 0,03% (p/v)**

**Xilen-cianol FF 0,03% (p/v)**

**Glicerol 60% (v/v)**

**EDTA 60 mM**

### **8.2.- Electroforesis de ARN.**

La integridad de las preparaciones de ARN tras la extracción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en tampón TBE (1x) suplementado con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), utilizando el mismo tampón como electrolito. La muestra de ARN (2 µg) se aplicó al pocillo del gel tras mezclarla con un volumen adecuado de solución de carga de ARN y calentar a 65 °C durante 10 min. La electroforesis se realizó a 50 voltios durante el tiempo necesario para que las bandas correspondientes al ARN ribosómico se separaran suficientemente. La visualización de las moléculas de ARN se realizó tras exposición del gel a luz ultravioleta en un trans-iluminador.

#### **Reactivos**

##### **Solución de carga para electroforesis de ácidos nucleicos ARN (6x):**

**MOPS-NaOH 20 mM pH 7,0**

**Azul de bromofenol 0,03% (p/v)**

**Xilen-cianol FF 0,03% (p/v)**

**Formamida (desionizada) 66% (v/v)**

**Formaldehido 23% (v/v)**

**EtBr 0,004% (p/v)**

### **8.3.- Separación eletroforética de proteínas.**

Las electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS se realizaron en geles según Laemmli (1970) en células de electroforesis Mini Protean II y III de Bio-Rad. La composición del gel separador fue: TRIS-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1% (p/v), APS (persulfato amónico) 0,05% (p/v), N,N,N',N'-tetrametildiamina (TEMED) 0,1% (p/v) y acrilamida/bis-acrilamida al 7,5 o 10%. La composición del gel concentrador fue tampón TRIS-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1% (p/v), APS 0,05% (p/v), TEMED 0,1% (p/v) y acrilamida/bis-acrilamida 4%.

En condiciones desnaturalizantes y reductoras las muestras se mezclaron con tampón de carga de condiciones reductoras en una proporción 1/1 (v/v) y se calentaron a 100 °C durante 3 min. En condiciones no reductoras las muestras se mezclaron con tampón de carga condiciones no reductoras y no se calentaron. Las electroforesis se realizaron a 30 mA o a 15 voltios toda la noche.

### **Reactivos**

#### **Marcadores de masa molecular:**

- \* Marcadores preteñidos para SDS-PAGE de Bio-Rad: miosina (201,2 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (120,3 kDa), seroalbúmina bovina (100,2 kDa), ovoalbúmina (55,9 kDa), anhidrasa carbónica (38,3 kDa), inhibidor de tripsina de soja (29,7 kDa), lisozima (20,7 kDa) y aprotinina (7,0 kDa)
- \* Marcadores preteñidos para SDS-PAGE de Fermentas (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 y 10 kDa)
- \* Marcadores sin teñir para SDS-PAGE de Sigma-Aldrich: seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa)

#### **Tampón TRIS-Glicina (10x) (pH 8,3):**

TRIS 250 mM

Glicina 520 mM

#### **Tampón de electroforesis:**

TRIS-Glicina (1x) que contenía SDS al 0.1% (p/v)

#### **Tampón de carga Laemmli, condiciones reductoras:**

TRIS-HCl 100 mM (pH 6,8) que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol 71,5 mM, SDS al 2% (p/v), azul de bromofenol al 0,025% (p/v) y glicerol al 10% (v/v)

#### **Tampón de carga Laemmli, condiciones no reductoras:**

TRIS-HCl 100 mM (pH 6,8) que contenía SDS al 2% (p/v), azul de bromofenol al 0,025% (p/v) y glicerol al 10% (v/v)

## **8.4.- Tinción de los geles de acrilamida.**

### 8.4.1.- Coomassie estándar.

Los geles de acrilamida se sumergieron en la solución de tinte durante 1 hora. Posteriormente se realizaron una serie de lavados con solución de destinte hasta alcanzar el grado de tinción deseado.

#### **Reactivos**

##### **Solución de tinte:**

**Metanol 40% (v/v)**

**Ac. Acético 10% (v/v)**

**Coomassie R-250 0,1% (p/v)**

##### **Solución de destinte:**

**Metanol 40% (v/v)**

**Ac. Acético 10% (v/v)**

### 8.4.2.- Coomassie un paso.

Los geles de acrilamida se sumergieron en la solución de tinte hasta alcanzar el grado de tinción deseado como se indica en Zehr et al. (1989).

#### **Reactivos**

##### **Solución de tinte:**

**Etanol 10% (v/v)**

**Ac. Acético 5% (v/v)**

**Coomassie R-250 0.0016% (p/v)**

## **9.- SÍNTESIS DE ADNc**

Se utilizó el producto SMART™ RACE cDNA Amplification Kit suministrado por Clontech siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con este método se obtuvieron dos poblaciones de ADNc de primera cadena. La población 5'-RACE ADNc se obtuvo con un oligo dT (5'-CDS), realizándose la retrotranscripción en presencia del oligonucleótido SMART II de forma que éste

se introduce en el extremo 5' del ADNc. La población 3'-RACE ADNc se obtuvo realizando la retrotranscripción con el oligonucleótido 3'CDS que introduce en el extremo 3' la secuencia SMART II.

Para la síntesis del 5'-RACE ADNc se mezclaron en un tubo estéril de 0,2 ml los siguientes componentes: 1 µg de ARN total, 1 µl del oligonucleótido 5'-CDS (oligonucleótido oligo dT de síntesis del 5'-RACE ADNc), 1 µl de oligonucleótido SMART II y agua grado de mili-Q estéril hasta un volumen final de 5 µl. Se incubó la mezcla a 70 °C durante 2 min, se enfrió en hielo durante el mismo tiempo y se centrifugó brevemente. A continuación, se añadieron 2 µl de tampón de síntesis de primera cadena (5x), 1 µl de dNTPs (10 mM de cada uno), 1 µl de DTT 20 mM y 1 µl de transcriptasa inversa PowerScript. Se mezcló y se incubó a 42 °C durante 90 min en un incubador de aire. Transcurrido este tiempo, se incubó la mezcla a 72 °C durante 7 min para interrumpir la reacción de síntesis de la primera cadena. Las muestras se almacenaron a -20 °C y la síntesis de la segunda cadena se realizó con el primer ciclo de la PCR.

Para la síntesis del 3'-RACE ADNc se procedió igual que para la síntesis de 5'-RACE ADNc, excepto que los oligonucleótidos 5'-CDS y SMART II se sustituyeron por el oligonucleótido 3'-CDS.

**Oligonucleótidos suministrados en el kit comercial:**

**SMART II: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'**

**3'-CDS: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub> N<sub>1</sub> N-3'**

(N = A, C, G, o T; N<sub>1</sub> = A, G, o C)

**5'-CDS: 5'-(T)<sub>25</sub> N<sub>1</sub> N-3'**

(N = A, C, G, o T; N<sub>1</sub> = A, G, o C)

**UPM Largo: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGT  
ATCAACGCAGAGT-3'**

**UPM Corto: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'**

**Nested A: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'**

## **10.- CLONACIÓN DEL ADNc CODIFICANTE DE UNA NUCLEOTIDASA**

### **10.1.- Amplificación de los fragmentos 5'-RACE y 3'-RACE.**

Utilizando las dos poblaciones de ADNc obtenidas como se indica en el apartado anterior (5'-RACE y 3'-RACE ADNc) se realizan reacciones de PCR con las parejas de oligonucleótidos NESTED-NTD1 para el 3'-RACE y los oligonucleótidos UPM-NTD2 para 5'-RACE utilizando el kit *Advantage<sup>®</sup> 2 PCR Enzyme System* (Clontech). Las mezclas de PCR contenían, en un volumen total de 50 µl ajustado con agua, los siguientes componentes:

- 5 µl de tampón de PCR Advantage 2 (10x)
- 1 µl de mezcla dNTPs (10 mM de cada uno)
- 1 µl de polimerasa Advantage 2 (50x)
- 2,5 µl de ADNc de primera cadena (5'-RACE o 3'-RACE ADNc)
- 1 µl de oligonucleótido específico del gen (NTD1 ó NTD2)
- 5 µl de oligonucleótido NESTED o UPM

Se realizaron reacciones de PCR con las siguientes condiciones:

- 35 ciclos (3'RACE) - 40 ciclos (5'RACE)
- 94 °C durante 1 min
- 68 °C durante 1 min
- 72 °C durante 1,5 min
- 10 min de extensión final a 72 °C

Los fragmentos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se purificaron siguiendo las instrucciones del kit NucleoTrap Gel Extracción (Clontech Laboratories, Inc). Los fragmentos purificados se introdujeron por ligación en pGEM-T (Promega) como se indica en el apartado 11.1.



**10.2.- Amplificación del ADNc completo.**

El ADNc completo del gen que codifica la posible nucleotidasa se obtuvo mediante PCR sobre ADNc de primera cadena en 5'-RACE con la pareja de oligonucleótidos NTD3 - NTD8 utilizando el siguiente programa:

35 ciclos

94 °C durante 1 min

62 °C durante 1 min

72 °C durante 2 min

10 min de extensión final a 72 °C

**Oligonucleótidos:**

NTD3----- 5'-GACACTATAATGAATTATAGCTTCCA-3'

NTD8----- 5'-TTAATGGTTGAGATTGTGAACAG-3'

**11.- LIGACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN Y VECTORES PLASMÍDICOS****11.1.- Ligación de moléculas de ADN en pGEM-T.**

La clonación de los fragmentos amplificados mediante PCR se realizó en el vector pGEM-T (Promega). Este plásmido es de alto número de copias y se comercializa en forma abierta después de haber sido digerido enzimáticamente mediante la endonucleasa *EcoRV* y haber sido modificado químicamente mediante la adición de dos restos de timidina en la posición 3' de los dos extremos romos. Estos residuos permiten la ligación directa de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR con ADN polimerasas termoestables que añaden sistemáticamente un residuo de deoxiadenosina a los extremos 3'.

La cantidad adecuada de inserto se mezcló con pGEM-T, ADN ligasa de T4 y tampón de ligación (2x) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se incubó a 4 °C durante unas 14 h. La cantidad de inserto necesaria se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Cantidad de inserto } (\mu\text{g}) = \frac{3 * \text{Tamaño del inserto (pb)} * \text{Cantidad de vector } (\mu\text{g})}{\text{Tamaño del vector (pb)}}$$

Las células competentes se transformaron con el producto de la ligación como se ha indicado en el apartado 7.5.

### **11.2.- Selección de transformantes con pGEM-T.**

La selección de transformantes positivos para las construcciones derivadas del vector pGEM-T se realizó sembrando las células transformadas sobre placas LB-agar suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml, IPTG 0,3 mM y X-gal 0,02 mg/ml. Estas placas se incubaron a 37 °C durante unas 14 h y las colonias obtenidas se seleccionaron inicialmente por color. El color blanco es el resultado de la interrupción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa mediante inserción del fragmento de ADN exógeno, impidiendo así la síntesis correcta de la enzima que capacitaría a la bacteria para hidrolizar el X-gal y producir el compuesto (5-bromo-4-cloro-3-indol) que colorea la colonia de azul. Los transformantes seleccionados se cultivaron en medio líquido y la presencia del inserto correcto se comprobó mediante PCR y mediante secuenciación del plásmido aislado.

### **11.3.- Ligación de moléculas de ADN en pET30b(+).**

Para la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizó el vector pET30b(+) (Novagen). Este plásmido es de bajo número de copias y añade a uno o ambos extremos de la proteína recombinante una cola de histidinas que permite su purificación e identificación. La cantidad de inserto necesaria se calculó según la ecuación descrita con anterioridad. Una vez determinados los volúmenes de inserto y vector necesarios, se mezclaron con 1  $\mu$ l de ADN ligasa de T4 y 1.5  $\mu$ l de tampón de ligación (10x) en un volumen final de 15  $\mu$ l. La

mezcla se incubó a 4 °C durante unas 14 h. Posteriormente se realizó la transformación de células competentes de la cepa de *E. coli* elegida.

#### **11.4.- Selección de transformantes con pET30b(+).**

La selección de transformantes positivos para las construcciones derivadas del vector pET30b(+) se realizó sembrando las células transformadas sobre placas LB-agar que contenían 0,03 mg/ml de kanamicina. Estas placas se incubaron a 37 °C durante unas 14 h. Las colonias obtenidas se analizaron mediante PCR y aquellos clones en los que se amplificó un fragmento del tamaño esperado se secuenciaron para confirmar la secuencia introducida y la ausencia de mutaciones en el plásmido recombinante.

### **12.- SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS**

Para secuenciar ADN bicatenario se utilizó el método “dye terminator” en un secuenciador automático ABI *PRISM<sup>TM</sup>* 373 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU). La secuenciación se realizó en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba.

### **13.- CLONACIÓN EN VECTOR DE SOBREENPRESIÓN**

#### **13.1.- Clonación para sobreexpresar una proteína con posible actividad nucleotidasa.**

A ambos lados de la región codificante del ADNc que codifica la posible nucleotidasa se introdujeron sitios de corte para enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* mediante la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos NTE1, que contiene los 18 primeros nucleótidos de la región codificante y un sitio de restricción para la enzima *NcoI* en el extremo 5', y el oligonucleótido NTE2, que corresponde al codón de terminación y a los 15 nucleótidos precedentes más un sitio de restricción para la enzima *XhoI* en el extremo 5'. El fragmento de ADN amplificado obtenido tras la reacción de PCR se recortó y purificó del gel

de agarosa como se ha descrito anteriormente y se introdujo en el vector pGEM-T mediante ligación. Se transformaron células DH5 $\alpha$  y los transformantes seleccionados por color se analizaron mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos internos del vector pGEM-T (SP6 y T7) y la pareja de oligonucleótidos específicos NTE1 y NTE2.

Los plásmidos de los transformantes positivos y el vector pET30b(+) se sometieron a digestión con las enzimas de restricción *Nco*I y *Xho*I. A continuación se resolvieron mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa y se extrajeron los fragmentos de interés. Ambas moléculas de ADN se unieron mediante ligación como se ha indicado en el apartado anterior y a continuación se transformaron células de *E. coli* BL21. Los transformantes obtenidos se confirmaron mediante PCR con la pareja de oligonucleótidos NTE1 y NTE2. Los plásmidos de los transformantes positivos se secuenciaron para comprobar la ausencia de mutaciones.

#### **Reactivos**

##### **\* Oligonucleótidos:**

NTE1----- 5'-CTATCCATGGCAATGAATTATAGCTTCCAA-3'

NTE2----- 5'-CCAACTCGAGTCAACACATTTGAGAGAC-3'

##### **\* PCR**

**Polimerasa Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech)**

**Condiciones:**

**35 ciclos**

**95 °C durante 1 min**

**50 °C durante 1 min**

**72 °C durante 1 min y 30 seg**

**10 min de extensión final a 72 °C**

### **13.2.- Clonación para sobreexpresar una proteína a partir de un ADNc que codifica una alantoinasa.**

A ambos lados de la región codificante del ADNc que codifica una posible alantoinasa se introdujeron sitios de corte para enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I mediante amplificación por PCR utilizando el oligonucleótido ESA3, que contiene los 18 primeros nucleótidos de la región codificante y un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI en el extremo 5', y el oligonucleótido ESA2, que corresponde al codón de terminación y a los 15 nucleótidos precedentes más un sitio de restricción para la enzima *Sal*I en el extremo 5'. El fragmento de ADN obtenido tras la reacción de PCR se recortó y purificó del gel de agarosa como se ha descrito anteriormente y se procedió a introducirlo en el vector pGEM-T mediante ligación. Se transformaron células DH5 $\alpha$  y los transformantes seleccionados por color se analizaron mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleótidos internos del vector pGEMt (SP6 y T7) y la pareja de oligonucleótidos específicos ESA3 y ESA2. El ADN plasmídico de los transformantes positivos y el vector pET30b(+) se sometieron a digestión con las enzimas de restricción *Ban*HI y *Sal*I. A continuación se resolvieron mediante electroforesis de ADN en gel de agarosa y se extrajeron los fragmentos de interés. Ambos fragmentos se unieron mediante ligación y se transformaron células BL21. Los transformantes obtenidos se confirmaron mediante PCR con la pareja de oligonucleótidos ESA3 y ESA2 y los plásmidos de los positivos se secuenciaron para comprobar la ausencia de mutaciones.

#### **Reactivos**

##### **\* Oligonucleótidos:**

ESA2 5'- ATTTAGTCGACTCATGTGGCTAGAATTTG -3'

ESA3 5'- CGGATCCGATGCCTGGCCTGATTGAT -3'

##### **\* PCR**

**Polimerasa Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech)**

**Condiciones:****35 ciclos****95 °C durante 1 min****54 °C durante 1 min****75 °C durante 2 min****10 min de extensión final a 72 °C****14.- SOBREEXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA CUYO ADN<sub>c</sub> CODIFICA UNA ACTIVIDAD NUCLEOTIDASA****14.1.- Condiciones de expresión.**

Las células de *E. coli* que contenían el plásmido recombinante pET30b(+) para la nucleotidasa se cultivaron en matraces con 25 ml de medio de cultivo para inducción (ver más adelante), en agitación a 200 rpm y a 37 °C. Alcanzada una densidad óptica de 0,6 a 595 nm, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM. Los cultivos se incubaron durante diferentes tiempos y a diferentes temperaturas. La inducción rutinaria se realizó a 30 °C durante 2 horas. Terminada la inducción, las bacterias se recogieron por centrifugación a 2.000 g a 4 °C y se utilizaron directamente para su lisis o se congelaron a -20 °C.

**Reactivos****Medio de cultivo para inducción:****LB liquido****kanamicina 0,03 mg/ml****glucosa 1% (p/v)****14.2.- Procedimiento de lisis.**

Las bacterias obtenidas de 25 ml de cultivo líquido se resuspendieron en 4 ml de tampón de lisis (ver más adelante). Las bacterias se rompieron por ultrasonidos en un equipo Vibra Cell (Sonics and Materials INC., Danbury, Connecticut, USA) aplicando 6 pulsos de 5 s cada uno, manteniéndose en todo momento las muestras en hielo. El homogenado se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos

y a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se denominó extracto crudo de lisis. En condiciones no desnaturizantes, no se añadió urea al tampón de lisis.

#### **14.3.- Purificación en columna.**

La proteína sobre-expresada se purificó por unión a  $\text{Ni}^{+2}$  en columna de Chelating sepharose (GE Healthcare) de 8 ml preparada siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aplicaron 5 ml de extracto crudo de lisis sobre la columna, se lavó con 7 volúmenes de tampón de lavado y por último se aplicaron 3 volúmenes de tampón de elución (ver más adelante). Las fracciones obtenidas se mantuvieron a 4 °C para su posterior análisis mediante SDS-PAGE y Western blot. En condiciones no desnaturizantes, no se añadió urea a los tampones utilizados.

#### **Reactivos**

##### **Tampón de lisis:**

TRIS-HCl 50 mM pH 7,8 que contenía PMSF 1 mM, NaCl 500 mM y urea 8 M

##### **Tampón de lavado:**

TRIS-HCl 50 mM pH 7,8 que contenía NaCl 500 mM, urea 8 M e imidazol 25 mM

##### **Tampón de elución:**

TRIS-HCl 50 mM pH 7,8 que contenía NaCl 500 mM, urea 8 M e imidazol 300 mM

### **15.- SOBREEXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA CUYO ADN<sub>c</sub> CODIFICA UNA ALANTOINASA.**

#### **15.1.- Condiciones de expresión.**

El procedimiento fue idéntico al descrito en el apartado 13.3.1 salvo que el tiempo de inducción rutinaria se redujo a 1 hora.

**15.2.- Procedimiento de lisis.**

El procedimiento fue idéntico al descrito anteriormente. El sobrenadante obtenido se denominó extracto crudo de lisis.

**15.3.- Purificación en columna.**

La proteína sobre-expresada se purificó por unión a  $\text{Ni}^{+2}$  en columna de Chelating sepharose (GE Healthcare) de 8 ml preparada siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aplicaron 5 ml de extracto crudo de lisis sobre la columna, se lavó con 4 volúmenes de tampón de lavado 25 seguido de 4 volúmenes de tampón de lavado 40 y por último se aplicaron 3 volúmenes de tampón de elución (ver más adelante). Las fracciones obtenidas se mantuvieron a 4 °C para su posterior análisis mediante SDS-PAGE y Western blot. En condiciones no desnaturizantes, no se añadió urea a los tampones.

**Reactivos****Tampón de lavado 25:**

TRIS-HCl 50 mM pH 7,8 que contenía NaCl 500 mM, urea 8 M e imidazol 25 mM

**Tampón de lavado 40:**

TRIS-HCl 50 mM pH 7,8 que contenía NaCl 500 mM, urea 8 M e imidazol 40 mM

**Tampón de elución:**

TRIS-HCl 50 mM pH 7,8 que contenía NaCl 500 mM, urea 8 M e imidazol 300 mM

**16.- PROCEDIMIENTO DE DIÁLISIS**

Las proteínas recombinantes purificadas se dializaron utilizando membranas de celulosa para diálisis (Sigma-Aldrich). Las membranas se prepararon para su uso lavándolas en abundante  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada y a continuación se colocaron en  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ durante unas 14 h y en agitación continua a 4 °C.



**Reactivos****Tampón Salino (inoculación):**

Consistente en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{NaCl}$  0,14 M y  $\text{KCl}$  2,7 mM

**17.- OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS**

Se utilizaron conejos blancos New Zealand como animal de producción. Antes de inyectar el antígeno por primera vez, se extrajo sangre de la arteria central de la oreja de los conejos para obtener el suero pre-inmune. La sangre así recogida se incubó una hora a 37 °C para favorecer la formación de un coágulo que contuviera las células sanguíneas. Después se centrifugó a 25.000 g durante 30 min y a 4 °C, se recogió el sobrenadante (suero) y se repartió en partes alícuotas que se conservaron a -20 °C. El procedimiento para obtener el suero inmune fue el mismo salvo que se realizó después de las distintas inmunizaciones y estos sueros fueron titulados.

Para la inmunización se utilizó proteína purificada y dializada en tampón salino. Las distintas concentraciones de proteína utilizadas se prepararon conjuntamente y se conservaron a -20 °C hasta el día de inoculación. Se realizó una primera inoculación con adyuvante completo de Freund y 250 µg de proteína. La segunda y tercera inoculación se produjo con 125 µg de proteína y adyuvante incompleto de Freund a los 21 y 42 días de la primera inoculación. Las inmunizaciones se llevaron a cabo inyectando 2 ml de homogenado en 4 dosis a ambos lados de la zona dorsal de la escápula y las caderas de los conejos.

**18.- ELECTROTRANSFERENCIA Y ENSAYO DE WESTERN BLOT**

Después de las electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Sigma-Aldrich) mediante electrotransferencia en una célula Mini-TransBlot (Bio-Rad) o por transferencia semiseca en TE 70 ECL Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Biosciences).

La membrana de PVDF se activó con un lavado en metanol absoluto durante 3 min y se mantuvo en tampón de transferencia hasta su uso. La transferencia se realizó a un amperaje constante de 240 mA durante 60 min a 4 °C, independientemente del sistema utilizado. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó con tampón T-TBS y se bloqueó con T-TBS suplementado con 5% (p/v) de leche desnatada en polvo durante al menos 30 min, a temperatura ambiente y en agitación constante.

### **18.1.- Detección de proteína heteróloga con cola de histidinas.**

Se utilizó el anticuerpo primario anti-histidinas (H1029 Sigma-Aldrich) a un título de 1:5.000 en T-TBS suplementado con 0,5% (p/v) de leche desnatada en polvo, durante 1 hora y a temperatura ambiente. A continuación se lavó 3 veces con T-TBS durante 10 min cada lavado. Se aplicó el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón (A3562 Sigma-Aldrich) desarrollado en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina a un título de 1:10.000 en T-TBS durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 3 veces con T-TBS durante 10, 10 y 5 min consecutivamente. La actividad fosfatasa alcalina asociada a los anticuerpos secundarios se desarrolló mediante la adición de la solución de revelado sobre la membrana de PVDF y, una vez desarrollado el color púrpura, la reacción se paró mediante varios lavados con agua destilada.

### **18.2.- Detección de proteína nativa en tejidos vegetales.**

Se utilizó como anticuerpo primario el suero inmune a un título de 1:2.500 en T-TBS suplementado con 0,5% (p/v) de leche desnatada en polvo, durante 1 hora y a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con T-TBS durante 10 min cada lavado. Se aplicó el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de conejo (A3687 Sigma-Aldrich) desarrollado en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina a un título de 1:10.000 en T-TBS durante 1 h a temperatura ambiente. A

continuación, la membrana se lavó y se desarrolló como se indica en el apartado anterior.

**Reactivos****Tampón de electrotransferencia:**

**TRIS-Glicina (1x) (pH 8,3) que contenía metanol al 20%**

**T-TBS :**

**TRIS-HCl 24,8 mM (pH 7,4) que contenía KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM y Tween-20 al 0,1% (v/v)**

**Solución de revelado:**

**TRIS-HCl 100 mM (pH 9,5)**

**MgCl<sub>2</sub> 5 mM**

**Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol (BCIP) 0,4 mM**

**Azul de nitrotetrazolio (NBT) 0,37 mM**

## **19.- SEPERACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (DEAE)**

El extracto crudo se cargó en una columna (9 x 2,6 cm) de Dietilaminoetil-Sephacel® (DEAE-Sephacel®) (Sigma-Aldrich) equilibrada con tampón de trabajo. La columna se lavó con 200 ml de tampón de trabajo que contenía NaCl 0,12 M y la elución se realizó en dos gradientes: el primero de 0,12 a 0,30 M de NaCl en un volumen de 300 ml de tampón de trabajo y el segundo de 0,30 a 1,00 M de NaCl en 100 ml. Todo el proceso se realizó a un flujo de 1 ml/min y se recogieron fracciones de 2,5 ml.

**Reactivos****Tampón de trabajo:**

**TRIS-HCl 20 mM pH 7,8 que contenía MnSO<sub>4</sub> 1mM**

**20.- INMUNOPRECIPITACIÓN**

La inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando proteína A unida a sefarosa. Una pequeña cantidad de resina se introdujo en un vial de 1,5 ml y se procedió a su hidratación y lavado con T-TBS. 40  $\mu$ l de la resina hidratada se colocó en un vial limpio y se añadieron 50  $\mu$ l de T-TBS y 3  $\mu$ l de suero inmune. Se incubó en hielo durante 90 min en agitación y se lavó con T-TBS, recogiendo la resina por centrifugando a 2.700 g durante 3 min y a 4 °C.

A los extractos proteicos se añadió  $\beta$ -mercaptoetanol, SDS y glicerol para unas concentraciones finales de 8,7 mM, 0,86% (p/v) y 10% (v/v), respectivamente. A continuación se incubaron a 100 °C durante 2 min, se enfriaron en hielo y se colocó un volumen adecuado de éstos en la resina de proteína A sefarosa con anticuerpo unido, preparada anteriormente. Se incubaron a 4 °C y en agitación durante unas 14 h. A continuación se eliminó el sobrenadante tras centrifugar durante 1 min a 750 g y se lavó la resina por 3 veces con T-TBS. Eliminado el sobrenadante del último lavado se añadieron 35  $\mu$ l de tampón de carga Laemmli con  $\beta$ -mercaptoetanol y se incubó a 100 °C durante 3 min para posteriormente analizar por SDS-PAGE.

**21.- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE GELES DE ACRILAMIDA**

La fracción del gel en la que se encuentra la proteína de interés se recortó utilizando una cuchilla limpia y se introdujo en un tubo de 1,5 ml. Se añadieron 200  $\mu$ l de T-TBS y se machacó con ayuda de un bastoncillo hasta conseguir la disgregación homogénea del gel. A continuación se incubó durante 30 min en hielo. El homogenado conseguido se colocó en un sistema de concentración Nanosep(R) Centrifugal Devices (PALL) con un corte de paso de 300 kDa. Se centrifugó durante 3 min a 12.100 g en una centrifuga a 4 °C, lo que permitió separar la proteína de la acrilamida, que quedó retenida en el filtro. Opcionalmente se utilizó un Nanosep(R) con un corte de paso de 3 kDa para concentrar o dializar la proteína extraída.

## **22.- DEGLICOSILACIÓN**

Una cantidad apropiada de la proteína problema se diluyó a 30 µl y se añadieron 10 µl de tampón fosfato. Se mezcló y se incubó la solución a 100 °C durante 5 min. Transcurrido este tiempo se enfrió en hielo, se añadió 1 µl de N-glicosidasa F (5000 U/ml) y se incubó durante 3 h a 37 °C.

### **Reactivos**

**Tampón fosfato 250 mM, pH 7.0**

## **23.- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR HUELLA PEPTÍDICA (MALDI-TOF)**

Las bandas de proteína, visibles con tinción en Coomassie, se recortaron del gel de acrilamida y se mandaron al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba (UCO) para someterse a un proceso de identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, obteniéndose un espectro de masas (MS) denominado “Huella Peptídica”. Adicionalmente, se obtuvieron espectros de fragmentación (MS/MS) de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. El equipo utilizado fue un Espectrómetro de Masas MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems).

La identificación de proteínas se realizó automáticamente mediante el sistema GPS (Global Protein Server) acoplado a los datos del TOF-TOF, combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK) sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas.

## **24.- BASES DE DATOS Y SOFTWARE DE PREDICCIÓN Y ANÁLISIS**

### **24.1.- Bases de datos.**

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

ISI Web of Knowledge (<http://wokinfo.com/>).

Brenda, enzyme database (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

The DFCI *Medicago truncatula* Gene Index Computational Biology and Functional Genomics Laboratory at the Dana-Farber Cancer Institute and Harvard School of Public Health (<http://compbio.dfci.harvard.edu/index.html>).

Wed Phytosome (<http://www.phytosome.net/>).

#### 24.2.- Software de predicción y análisis.

HCpolya ([http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC\\_polya.html](http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwHC_polya.html)) (Milanesi et al. 1999)

TargetP Server v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson et al. 2000).

SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen et al. 2011)

Conserved Domain Database and Search Service, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer et al. 2011).

NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

FindPept tool, ExPASy - SIB Bioinformatics Resource Portal- (<http://web.expasy.org/findpept/>) (Gasteiger et al. 2003).

NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).



### **III.- RESULTADOS**



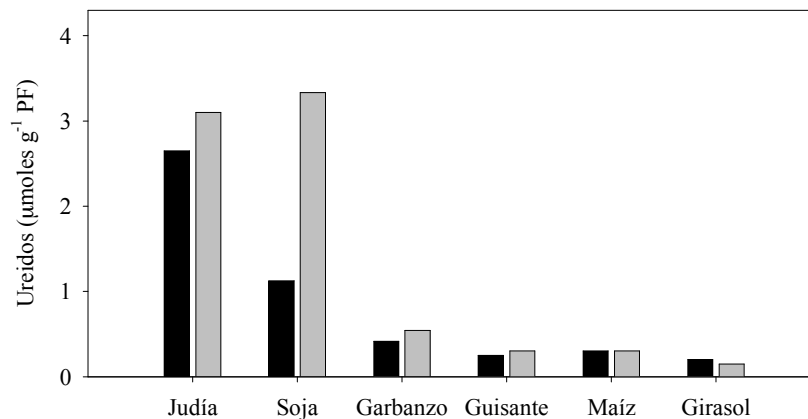


**1.- ACTIVIDADES DEGRADADORAS DE UREIDOS DURANTE LA  
GERMINACIÓN Y POSTERIOR DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE  
JUDÍA**



### 1.1.- Ureidos en diferentes especies.

Se analizó la concentración de ureidos en cotiledones de plántulas de varias especies en los días 1 y 9 de desarrollo (Figura 8). En el primer día ninguna de las especies había completado la germinación y se observó un mayor contenido de ureidos en judía y soja, las dos leguminosas ureídicas analizadas, siendo judía la que presentó los niveles más altos. Estas dos especies fueron las únicas que mostraron incremento en la concentración de ureidos desde el día 1 al 9 de desarrollo. Las concentraciones finales de ambas se igualaron al expresarlas por g de peso fresco. En el resto de especies, la concentración de ureidos en cotiledones permaneció constante entre los días 1 y 9.

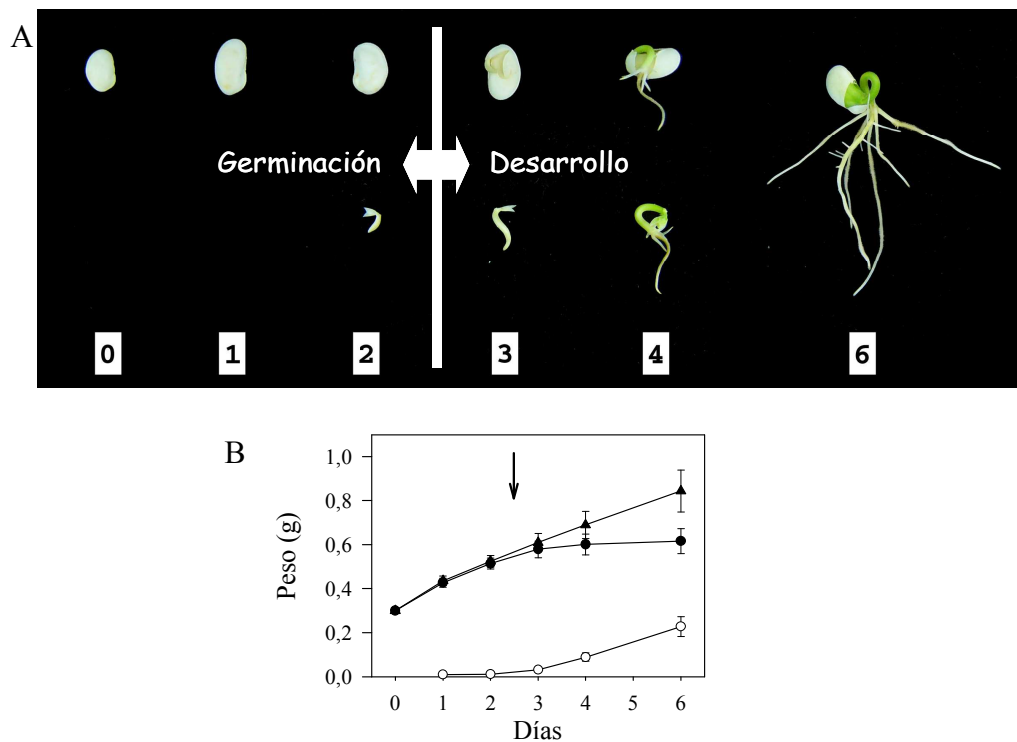


**Figura 8. Concentración de ureidos en cotiledones de diferentes especies.** Cotiledones de de plántulas de diferentes especies con 1 (barras negras) y 9 días (barras grises) de desarrollo se utilizaron para determinar la concentración de ureidos totales en los extractos obtenidos a partir de estos. Los datos se expresan por g de peso fresco.

### 1.2.- Germinación y desarrollo inicial de plántulas de judía.

En la Figura 9-A se muestran los diferentes estadios de judía durante la germinación y el desarrollo temprano, abarcando los primeros 6 días desde el inicio de la imbibición (DDI). La emergencia radicular se produjo entre los días

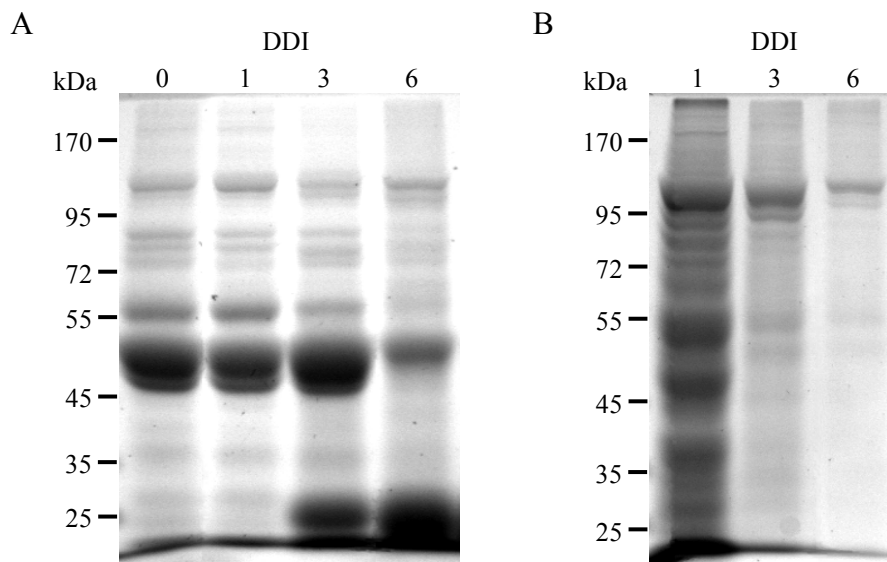
2 y 3, delimitando la germinación propiamente dicha y el desarrollo post-germinativo (Figura 9-A). El peso fresco de la plántula completa incrementó inicialmente por el aumento de peso de los cotiledones hasta la emergencia radicular y, a partir de ésta, por el aumento de peso del eje (Figura 9-B).



**Figura 9. Germinación y desarrollo inicial de plántulas de judía.** Las semillas de judía se germinaron como se indica en Materiales y métodos. (A) Fotografías de semillas completas y de los ejes embrionarios tomadas en los días después de imbibición (DDI) indicados. La barra transversal indica el momento de aparición de la radícula. (B) Peso fresco de las plántulas completas (triángulos negros), de sus cotiledones (círculos negros) y de sus ejes embrionarios (círculos blancos) para los DDI indicados. La flecha indica el momento de aparición de la radícula.

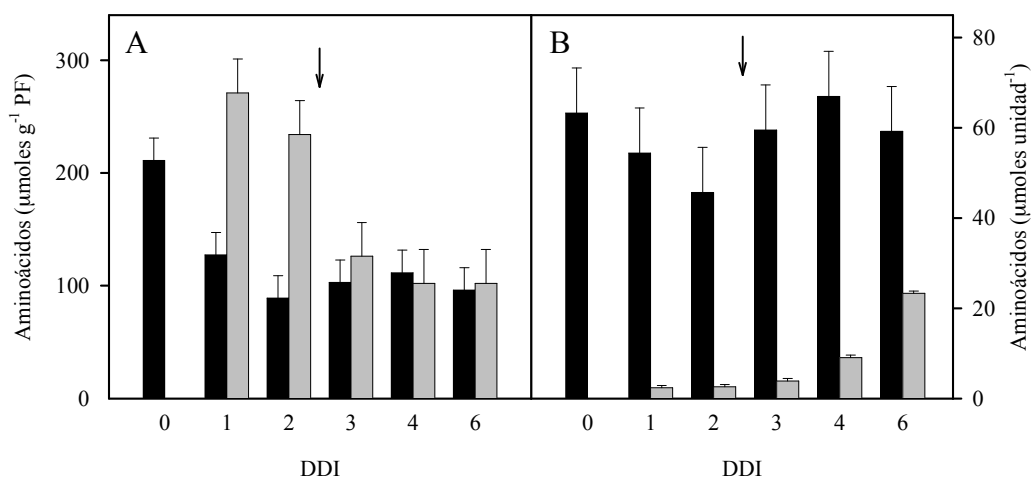
En el intervalo de tiempo analizado (hasta 6 DDI), el desarrollo de la plántula se realiza a partir de la movilización de las reservas acumuladas en las semillas. Se ha analizado la cantidad de globulinas solubles en ejes y cotiledones de judía (Figura 10). La faseolina, proteína de reserva en *Phaseolus vulgaris* y

cuya masa molecular oscila entre 51 y 45 kDa (Harada et al. 2010), es la proteína mayoritaria en los extractos obtenidos a partir de semillas secas (calle 0, Figura 10-A). La cantidad de faseolina en los cotiledones se mantuvo constante durante la germinación (hasta los 3 DDI) y disminuyó drásticamente a los 6 DDI (Figura 10-A). Tras la aparición de la radícula aumentó la cantidad de una proteína de 26 kDa que pasó a ser la mayoritaria en los extractos de cotiledones de 6 DDI (Figura 10-A). El patrón de proteínas en los extractos obtenidos a partir de ejes a 1 DDI fue distinta a la de cotiledones y la cantidad de estas proteínas disminuyeron rápidamente durante la germinación (Figura 10-B).



**Figura 10. Análisis de las globulinas en cotiledones y ejes de judía.** La abundancia de globulinas en ejes y cotiledones durante la germinación y desarrollo post-germinativo inicial de plántulas de judía se analizó mediante SDS-PAGE. Los extractos fueron obtenidos a partir de cotiledones (A) y ejes (B) a los DDI indicados en la figura. La carga en los geles se realizó con respecto a unidad funcional de tejido. En la calle indicada como 0 se cargó el extracto obtenido a partir de la semilla seca. En la parte izquierda se muestra la movilidad de los marcadores de peso molecular.

La concentración de aminoácidos libres totales en los ejes y cotiledones se analizó durante el mismo periodo de tiempo (Figura 11). La concentración de aminoácidos libres totales en semillas secas de judía fue de 63  $\mu$ moles por unidad. La cantidad de aminoácidos descendió durante el proceso de germinación (Figura 11-B) y a los 2 DDI la cantidad total en la plántula completa fue de 48,3  $\mu$ moles, presentes fundamentalmente en los cotiledones (45,7  $\mu$ moles frente a 2,6  $\mu$ moles totales en eje). Tras la aparición de la radícula, la cantidad de aminoácidos libres totales se incrementó y a los 6 DDI se determinaron 59,2  $\mu$ moles por par de cotiledones y 23,3  $\mu$ moles por eje. La cantidad de aminoácidos libres descendió durante la germinación tanto en cotiledones como en ejes cuando se expresó por g de peso fresco (Figura 11-A). Durante el desarrollo post-germinativo, la concentración de aminoácidos por gramo de peso fresco se mantuvo constante tanto en ejes como en cotiledones con un valor de 100  $\mu$ moles de aminoácidos por gramo de peso fresco (Figura 11-A).

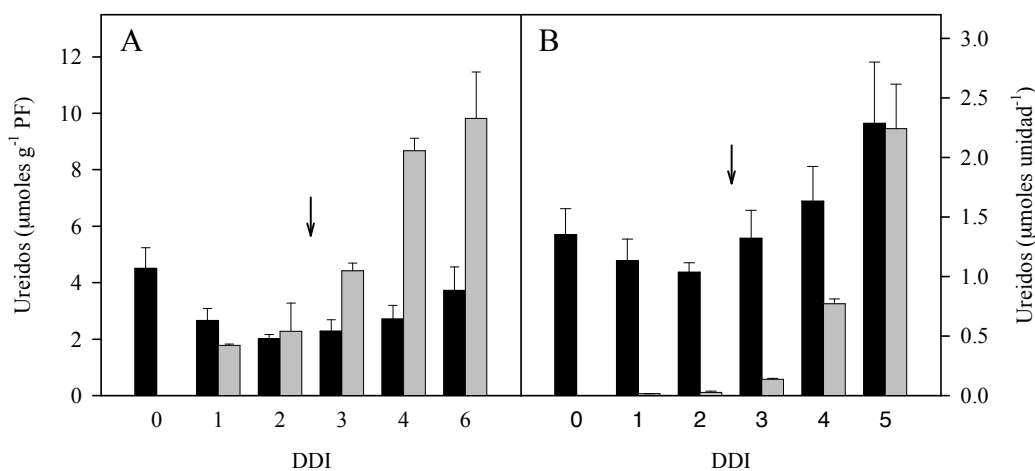


**Figura 11. Concentración de aminoácidos libres durante la germinación y desarrollo inicial en plántulas de judía.** Los extractos crudos fueron obtenidos a partir de cotiledones (barras negras) y ejes (barras grises) en los días indicados tras el comienzo de la imbibición (DDI). Los valores se representaron por gramo de peso fresco (A) y por unidad de tejido (B).

### **1.3.- Contenido de ureidos durante la germinación y el desarrollo inicial de judía.**

La concentración de alantoína y alantoato se determinó en los mismos extractos (Figura 12). El término ureidos totales engloba la suma de alantoína, alantoato y ureidoglicolato. La concentración de ureidos en semillas secas de judía fue de 1,3  $\mu$ moles por semilla (Figura 12-B) y de 4  $\mu$ moles por gramo de peso fresco, que corresponde a una concentración de ureidos en semilla seca de 0,1% (p/p) (Figura 12-A). La cantidad total de ureidos descendió ligeramente durante la germinación y 48 horas después del inicio de la imbibición se determinaron 1,18  $\mu$ moles por plántula completa (Figura 12-B). La mayor parte se determinaron en cotiledones (1,04  $\mu$ moles) y tan solo una pequeña cantidad (0,14  $\mu$ moles) en el eje (Figura 12-B). En este estadio (2 DDI), la cantidad de ureidos expresados frente a peso fresco fue similar en cotiledones y en ejes, correspondiendo a una concentración de 2  $\mu$ moles/g de peso fresco (Figura 12-A). Después de la aparición de la radícula, la cantidad total de ureidos se incrementó en ambas partes, siendo de 2,29  $\mu$ moles en cotiledones y de 2,24  $\mu$ moles en ejes a los 6 DDI (Figura 12-B). Este incremento también se observó al expresar la cantidad de ureidos frente a peso fresco (Figura 12-A). Por lo tanto, se produce una síntesis de ureidos durante los estadios iniciales del desarrollo de las plántulas. La concentración de ureidos a los 6 DDI fue mayor en ejes (Figura 12-A), y los valores de 10  $\mu$ moles/g PF corresponden al 0,2% (p/p) y a 0,1 mg de alantoato por mg de proteína total presente en el extracto crudo. El ácido alantoico representó siempre alrededor del 95% de los ureidos totales.





**Figura 12. Concentración de ureidos durante la germinación y desarrollo inicial en plántulas de judía.** Los extractos crudos fueron obtenidos de cotiledones (barras negras) y ejes (barras grises) en los días indicados tras el comienzo de la imbibición (DDI). Los valores se representaron por gramo de peso fresco (A) y por unidad de tejido (B).

La distribución de ureidos en las distintas partes de la plántula se ha analizado a los 5 y 9 DDI (Tabla 1). La cantidad de ureidos por g de peso fresco permaneció prácticamente constante en cotiledones, raíces e epicótilos, mientras que descendió ligeramente en hipocótilos (Tabla 1). Los ejes de judía experimentaron un gran incremento en su peso fresco durante este intervalo de tiempo desde los 74 mg a los 5 DDI hasta los 418 mg a los 9 DDI. Paralelo a este incremento se produjo otro en la cantidad total de ureidos aumentando desde los 0,87  $\mu\text{moles}$  a los 5 DDI hasta los 3,63  $\mu\text{moles}$  a los 9 DDI (Tabla 1).

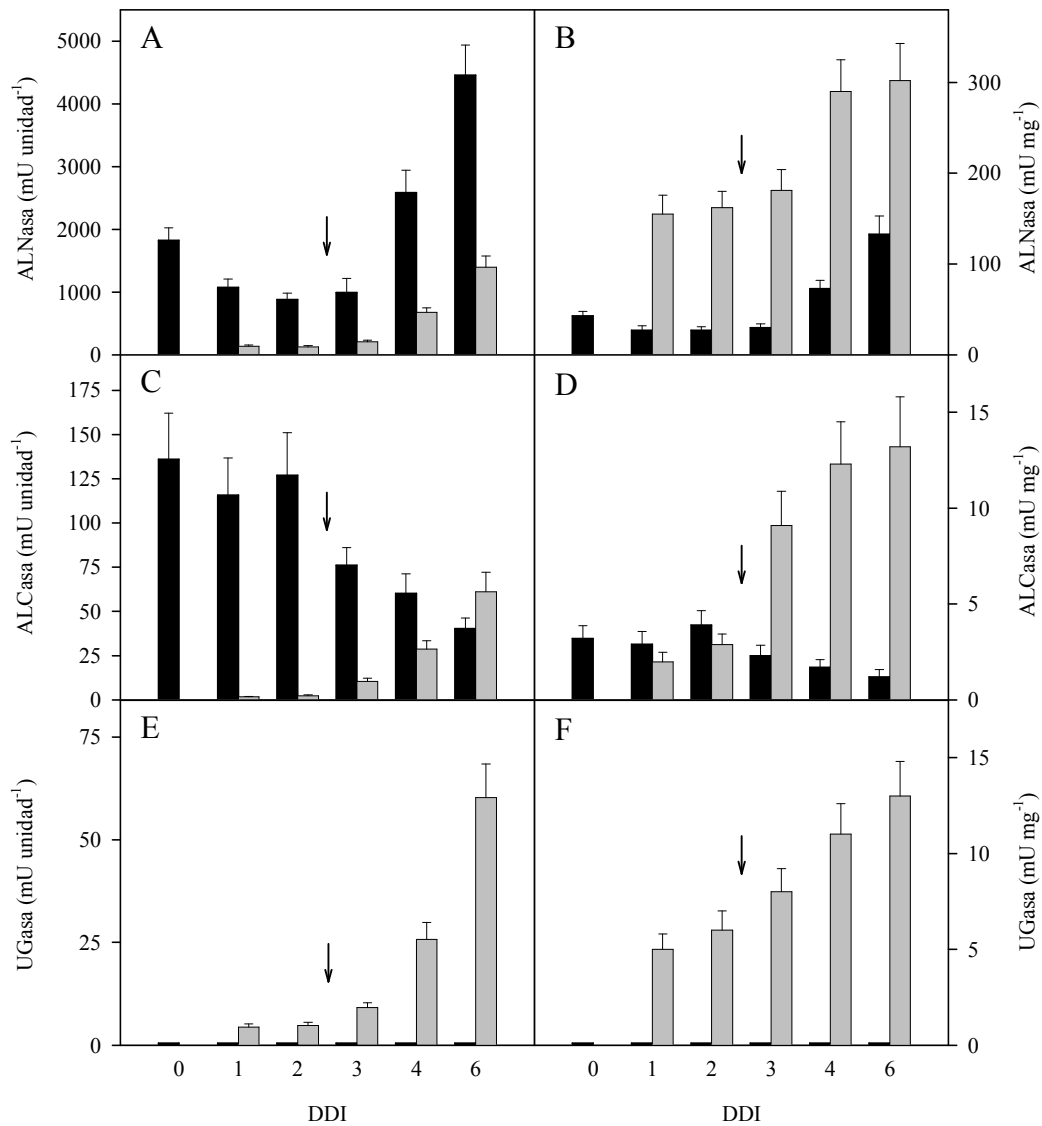
**Tabla 1. Concentración de ureidos en diferentes partes de plántula de judía.** Plántulas de 5 y 9 DDI fueron separadas en cotiledones, raíces, hipocótilos y epicótilos. Se obtuvieron extractos crudos y se determinaron los niveles de ureidos totales.

	5 DDI			9 DDI		
	PF(g)	$\mu\text{moles/g PF}$	$\mu\text{moles/unidad}$	PF(g)	$\mu\text{moles/g PF}$	$\mu\text{moles/unidad}$
Cotiledones	0,597	3,73	2,22	0,559	3,68	2,06
Ejes completos	0,074	11,76	0,87	0,418	8,68	3,63
Raíces	0.036	7.74	0.28	0.253	7.70	1.95
Hipocótilos	0.029	17.33	0.50	0.127	10.53	1.34
Epicótilos	0.009	10.39	0.09	0.038	8.90	0.34
Plántula completa	0.671	4.81	3.09	0.977	5.86	5.69

#### **1.4.- Actividades que catalizan la degradación de los ureidos durante la germinación y el desarrollo inicial.**

Las actividades enzimáticas implicadas en la degradación de los ureidos se determinaron en plántulas de judía durante la germinación y el desarrollo post-germinativo inicial (Figura 13). Las actividades que catalizan la degradación de alantoína y alantoato se detectaron en extractos crudos obtenidos a partir de semillas secas; sin embargo, no se detectó la actividad que cataliza la degradación del ureidoglicolato (Figura 13). El valor de la actividad que cataliza la degradación de la alantoína fue de un orden de magnitud superior al valor de la actividad que cataliza la degradación de alantoato. Durante la germinación, la actividad alantoinasa descendió ligeramente en cotiledones mientras que las actividades que catalizan la degradación de alantoato y ureidoglicolato no variaron (Figura 13). Las tres actividades se detectaron en los ejes embrionarios a las 24 horas después de imbibición y no variaron durante la germinación (Figura 13).

Los valores de las actividades enzimáticas sí cambiaron de forma importante tras la aparición de la radícula (Figura 13). En cotiledones, la actividad alantoinasa se incrementó (Figura 13-A y B) mientras que la actividad que cataliza la degradación del alantoato disminuyó (Figura 13-C y D). La actividad que cataliza la degradación del ureidoglicolato no se detectó nunca en los extractos obtenidos a partir de cotiledones (Figura 13-E y F). Este patrón de actividades enzimáticas en cotiledones (incremento en la actividad alantoinasa, descenso en la actividad que cataliza la degradación de alantoato y la no determinación de la actividad que cataliza la degradación de ureidoglicolato) se correlaciona con el incremento de la concentración de alantoato observada en cotiledones después de la germinación. En ejes embrionarios, los valores de actividad específica incrementaron después de la germinación para las tres actividades (Figura 13).



**Figura 13.** Actividades que catalizan la degradación de ureidos durante la germinación y posterior desarrollo inicial de plántulas de judía. Las semillas de judía se germinaron como se indica en Materiales y Métodos. Los extractos crudos fueron obtenidos de cotiledones (barras negras) y ejes embrionarios (barras grises) a los DDI indicados. Se determinó la actividad de la alantoinasa (ALNasa) y las degradadoras de alantoato (ALCasa) y de ureidoglicolato (UGasa). Las actividades enzimáticas se expresan frente a unidad de tejido (A, C y E), y frente a mg de proteína soluble total (B, D y F). El momento de la aparición de la radícula se indica con la flecha.

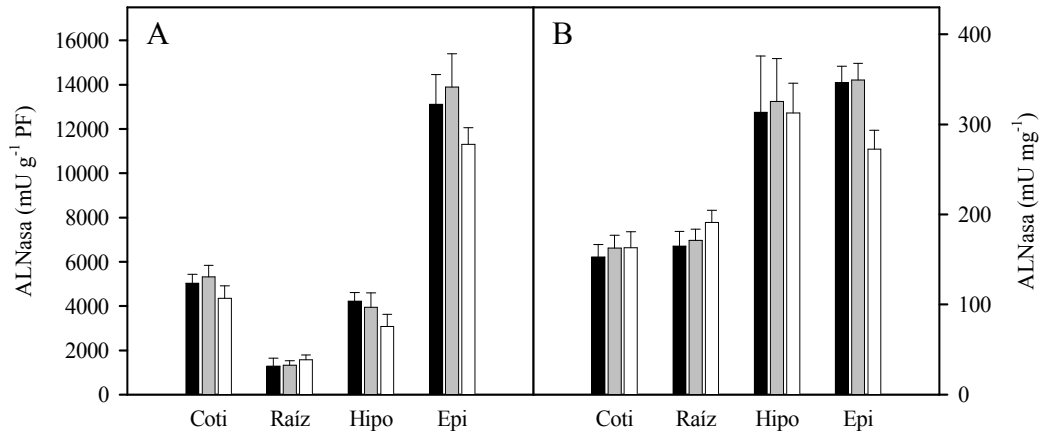
### 1.5.- Efecto de la sacarosa y del nitrato en la cantidad de ureidos y actividad alantoinasa.

La adición de nitrato (10 mM) o sacarosa (50 mM) al medio de imbibición no afectó ni a la tasa ni a la velocidad de germinación de judía, aunque la disponibilidad de nitrato sí dio lugar a un mayor desarrollo post-germinativo de los ejes en plántulas analizadas a los 6 DDI (Tabla 2). Asociado al mayor desarrollo, la cantidad total de ureidos por unidad de eje fue mayor en plántulas desarrolladas con nitrato mientras que los valores fueron similares al control en plántulas desarrolladas en presencia de sacarosa (Tabla 2). La concentración de ureidos expresada por g de peso fresco no se afectó en las distintas partes de plántulas a los 6 DDI por presencia de estos compuestos en el medio de imbibición, salvo en epicótilos donde fue mayor en presencia de nitrato (Tabla 2).

**Tabla 2. Concentración de ureidos en las distintas partes de plántulas embebidas en presencia de sacarosa o nitrato.** Las plántulas se desarrollaron en presencia de sacarosa (50 mM) o de nitrato (10 mM) en el medio de imbibición hasta los 6 DDI. Se obtuvieron los extractos crudos a partir de las distintas partes indicadas de las plántulas y se determinaron los niveles de ureidos totales. Los resultados son la media de tres experimentos.

	PF (g)	µmoles/unidad	µmoles/gPF
<b>Cotiledones</b>			
control	0,595 ± 0,069	2,30 ± 0,02	3,87 ± 0,18
+ sacarosa	0,566 ± 0,072	2,62 ± 0,35	4,62 ± 0,62
+ nitrato	0,564 ± 0,034	2,10 ± 0,05	3,72 ± 0,15
<b>Raíces</b>			
control	0,116 ± 0,033	0,91 ± 0,01	7,84 ± 0,62
+ sacarosa	0,104 ± 0,029	0,78 ± 0,16	7,56 ± 0,31
+ nitrato	0,172 ± 0,041	1,27 ± 0,18	7,42 ± 0,65
<b>Hipocótilos</b>			
control	0,061 ± 0,019	0,76 ± 0,01	12,45 ± 0,56
+ sacarosa	0,068 ± 0,018	0,79 ± 0,05	11,61 ± 1,68
+ nitrato	0,122 ± 0,027	1,42 ± 0,07	11,72 ± 0,54
<b>Epicótilos</b>			
control	0,028 ± 0,005	0,20 ± 0,04	7,14 ± 0,65
+ sacarosa	0,027 ± 0,005	0,21 ± 0,01	7,87 ± 0,77
+ nitrato	0,042 ± 0,007	0,48 ± 0,03	11,42 ± 0,78

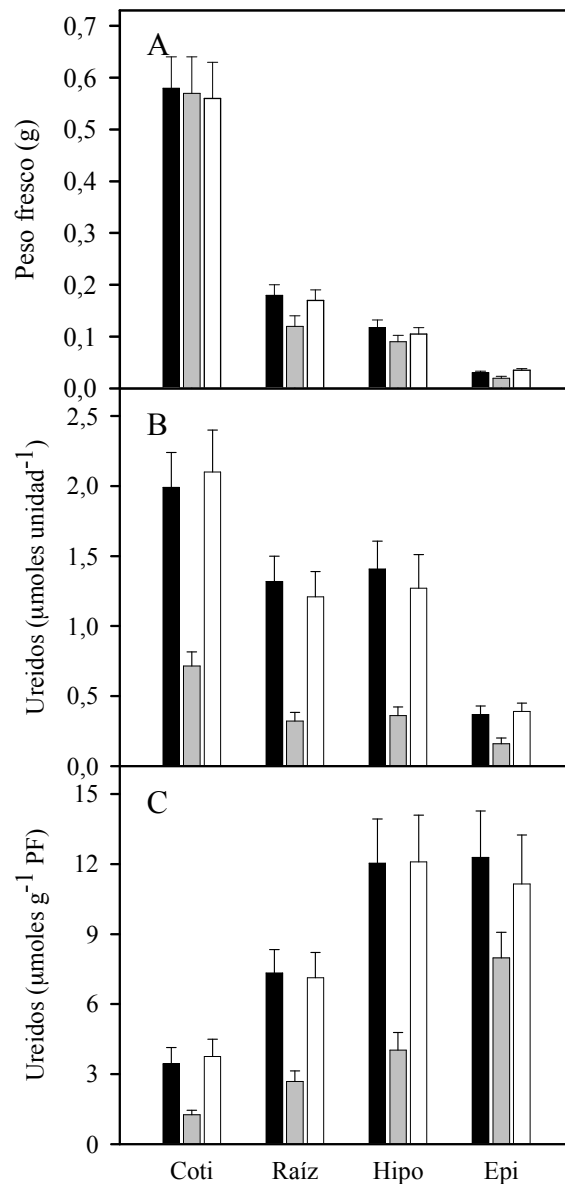
Los valores de la actividad alantoinasa tampoco se afectaron por la presencia de estos compuestos cuando se expresaron frente a gramo de peso fresco o frente a mg de proteína soluble (Figura 14).



**Figura 14.** Actividad alantoinasa en plántulas embebidas en presencia de sacarosa o nitrato. La actividad alantoinasa se determinó en los mismos extractos descritos en la Tabla 2 obtenidos a partir de plántulas embebidas en condiciones estándar (barras negras), en presencia de sacarosa 50 mM (barras grises) o nitrato 10 mM (barras blancas). Las plántulas se separaron en cotiledones (Coti), raíces (Raíz), hipocótilos (Hipo) y epicótilos (Epi). La actividad alantoinasa se expresó frente a peso fresco (A) o mg de proteína soluble (B).

### 1.6.- Efecto del alopurinol y del fenil-fosforo-diamidato en los niveles de ureidos y en la actividad alantoinasa.

Las plántulas de judía se desarrollaron en presencia de los compuestos alopurinol (inhibidor de la xantina deshidrogenasa) y de fenil-fosforo-diamidato (PPD, inhibidor de la ureasa) en el medio de imbibición (Figura 15). La inclusión de estos compuestos no afectó a la tasa de germinación de judía. En cuanto al desarrollo del eje, el alopurinol lo inhibió ligeramente cuando se analizó a los 6 DDI mientras que PPD no afectó (Figura 15-A). La presencia de PPD en el medio de imbibición no afectó a la cantidad de ureidos en plántulas

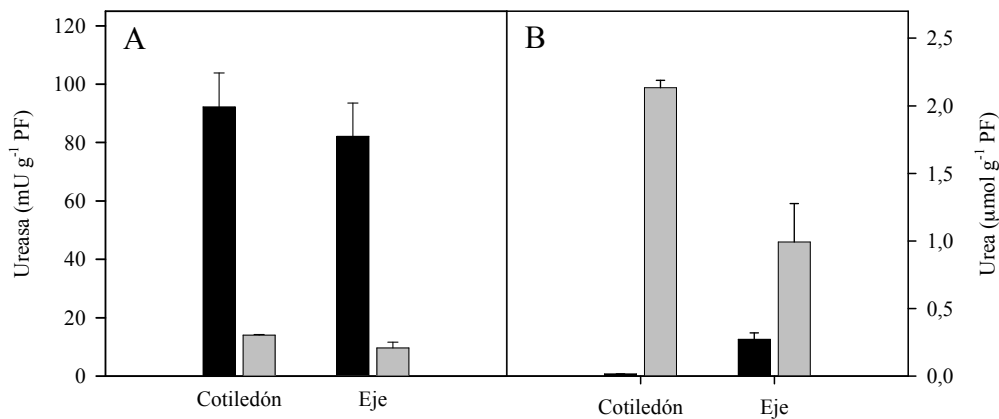


**Figura 15. Efecto del alopurinol y del PPD sobre la concentración de ureidos en plántulas de judía.** Semillas de judía se germinaron y crecieron como se indica en Materiales y Métodos en presencia de alopurinol 3 mM (barras grises), de PPD 0,1 mM (barras blancas) o en ausencia de inhibidores (barras negras) durante 6 días. Transcurridos éstos, las plántulas se separaron en cotiledones (Coti), raíces (Raíz), hipocótilos (Hipo) y epicótilos (Epi) y se determinó el peso fresco (A), los ureidos totales expresados por unidad de tejido (B) y por peso fresco (C).

mientras que la inclusión de alopurinol la redujo en todas las partes de la plántula, tanto por peso fresco como por unidad funcional (Figura 15). La

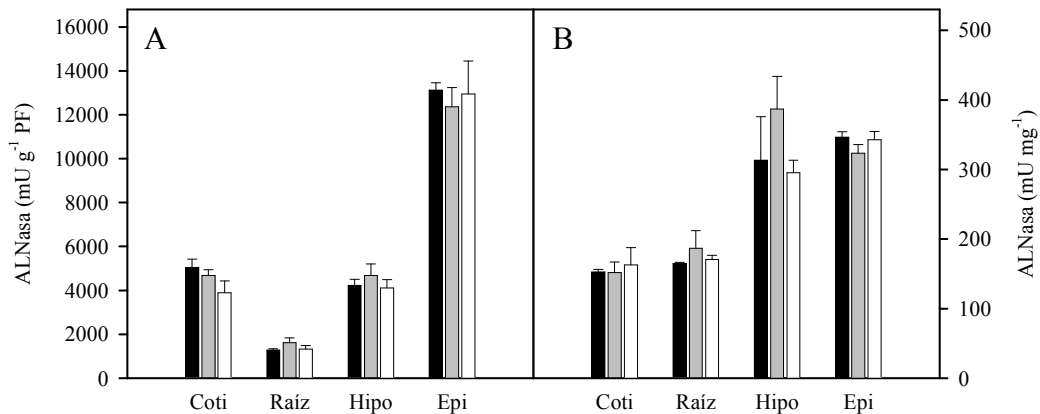
cantidad total de ureidos en las plántulas desarrolladas en presencia de alopurinol a los 6 DDI fue de 1,56 moles. Esta cantidad es muy similar a la determinada en las semillas secas, lo que podría sugerir una distribución de ureidos desde los cotiledones a los ejes (Figura 15). Ninguno de los compuestos afectó al porcentaje relativo entre ambos ureidos en extractos crudos y el ácido alantoico supuso alrededor del 95% de los ureidos totales presentes.

Debido a la ausencia de efecto del PPD sobre el desarrollo y la cantidad de ureidos se determinó la actividad ureasa en estas plántulas. La inclusión de PPD al medio de imbibición inhibió significativamente la actividad ureasa en los extractos crudos obtenidos a partir de cotiledones y ejes en desarrollo, determinándose valores del 20% con respecto a las plántulas no tratadas (Figura 16). Esta actividad remanente resultó limitante para el metabolismo de la urea puesto que la concentración de ésta fue mayor en estas plántulas tratadas (Figura 16-B). La concentración de PPD utilizada inhibió completamente la actividad ureasa ensayada *in vitro* en extractos crudos de judía.



**Figura 16.** Efecto del PPD sobre la actividad ureasa y la cantidad de urea en plántulas de judía. Semillas de judía se germinaron y crecieron como se indica en Materiales y métodos en ausencia (barras negras) y en presencia de PPD 100  $\mu\text{M}$  (barras grises). Tras 6 días de imbibición, la actividad ureasa (A) y la concentración de urea (B) se determinaron en los extractos obtenidos a partir de cotiledones y ejes.

En los extractos obtenidos de estas plántulas se determinó también la actividad alantoinasa. Los valores de actividad alantoinasa en las distintas partes de la plántula no se afectaron por la presencia de alopurinol o PPD en el medio de imbibición (Figura 17).



**Figura 17. Actividad alantoinasa en plántulas desarrolladas en presencia de los inhibidores alopurinol o fenil-fosforo-diamidato (PPD).** Semillas de judía se desarrollaron en presencia de alopurinol 3mM (barras grises), PPD 0.1mM (barras blancas) o en ausencia de inhibidores (barras negras). Transcurridos 6 días las plántulas se separaron en cotiledones (Coti), raíces (Raíz), hipocótilos (Hipo) y epicótilos (Epi). Se determinó la actividad alantoinasa presente en los extractos obtenidos a partir de estos tejidos y se representó frente a g de peso fresco (A) y mg de proteína soluble (B).

### 1.7.- Efecto de la eliminación de los cotiledones.

El metabolismo de ureidos se incrementa en los ejes en desarrollo tras la germinación. Para determinar si estos ejes tienen la capacidad de sintetizar ureidos se eliminaron los cotiledones justo después de la germinación y los ejes se desarrollaron durante 4 días adicionales en medios en presencia y ausencia de alopurinol (Figura 18-A). Los ejes sin cotiledones se desarrollaron mucho más lentamente que en plántulas completas y el peso fresco fue el mismo independientemente de la presencia o no de alopurinol (Figura 18-B).



La cantidad de ureidos totales por unidad de eje también fue menor en los ejes sin cotiledones con respecto a los desarrollados en su presencia como consecuencia del menor peso fresco puesto que la concentración de ureidos expresada por g de peso fresco fueron similares a los de los ejes de plántulas completas (Figura 18-C y E). La inclusión de alopurinol en el medio de imbibición inhibió este incremento en la concentración de ureidos tanto como ureidos totales como por gramo de peso fresco, siendo los valores similares a los de ejes de 3 días antes de eliminar los cotiledones (Figura 18-C y E). El efecto del alopurinol fue específico puesto que la inclusión de alopurinol al medio no afectó a los valores de aminoácidos totales (Figura 18-D y F).

También se determinó el efecto de la eliminación de los cotiledones en la inducción de la actividad alantoinasa en ejes tras la germinación (Figura 18-G y H). La actividad alantoinasa no mostró grandes variaciones en los ejes de plántulas a los 7 DDI independientemente de la presencia o ausencia de cotiledones y de alopurinol, tanto si la actividad se refiere a peso fresco de tejido (Figura 18-G) como si se refiere a cantidad de proteína soluble en los extractos (Figura 18-H).

**Figura 18 (página siguiente). Efecto de la eliminación de los cotiledones y la presencia de alopurinol sobre los niveles de ureidos y la actividad alantoinasa en ejes embrionarios.** A plántulas de judía de 3 días se les eliminaron los cotiledones; una parte de estos ejes embrionarios se homogenizaron en este momento (3 DDI, columnas negras) y el resto se separaron en dos grupos que se mantuvieron durante 4 días adicionales en ausencia (7 DDI-C, columnas gris claro) o presencia de alopurinol (7 DDI-C+AP, columnas gris oscuro) en el medio de cultivo. Transcurrido este tiempo se obtuvieron los extractos crudos a partir de estos ejes y los de ejes de plántulas control de 7 días, desarrolladas en presencia de cotiledones (7 DDI, columnas blancas).

**(A).** Esquema del proceso seguido con los distintos grupos de ejes utilizados.

**(B).** Peso fresco de los ejes.

**(C).** Cantidad de ureidos expresados por unidad de eje.

**(D).** Cantidad de aminoácidos expresados por unidad de eje.

**(E).** Cantidad de ureidos expresados por g de peso fresco.

**(F).** Cantidad de aminoácidos expresados por g de peso fresco.

**(G).** Actividad alantoinasa expresada por g de peso fresco.

**(H).** Actividad alantoinasa expresada por proteína soluble total.

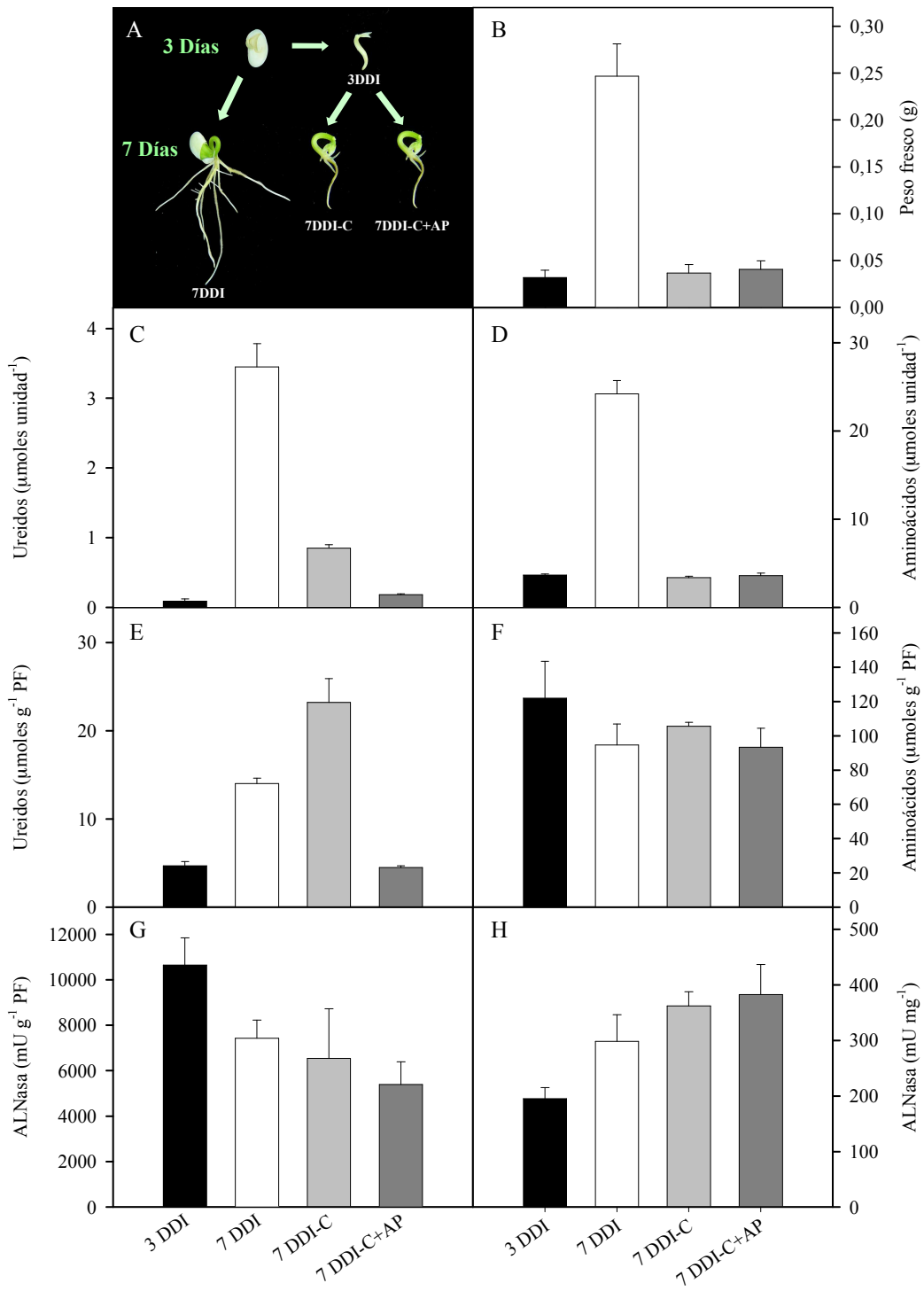
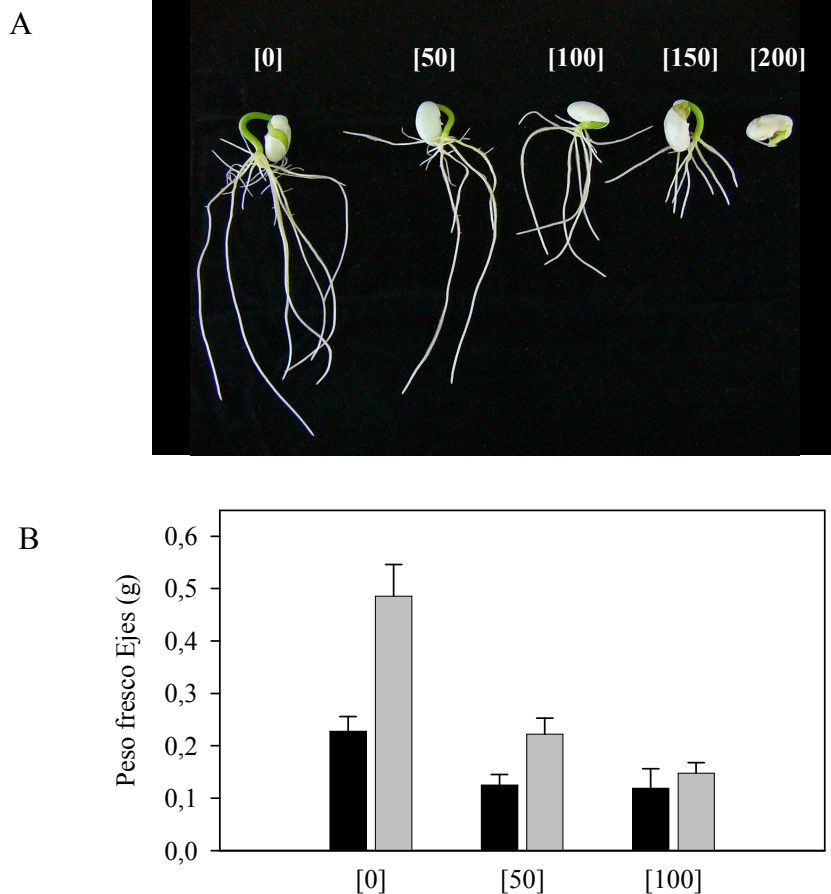


Figura 18.

### 1.8.- Efecto de NaCl durante la germinación y el desarrollo de judía.

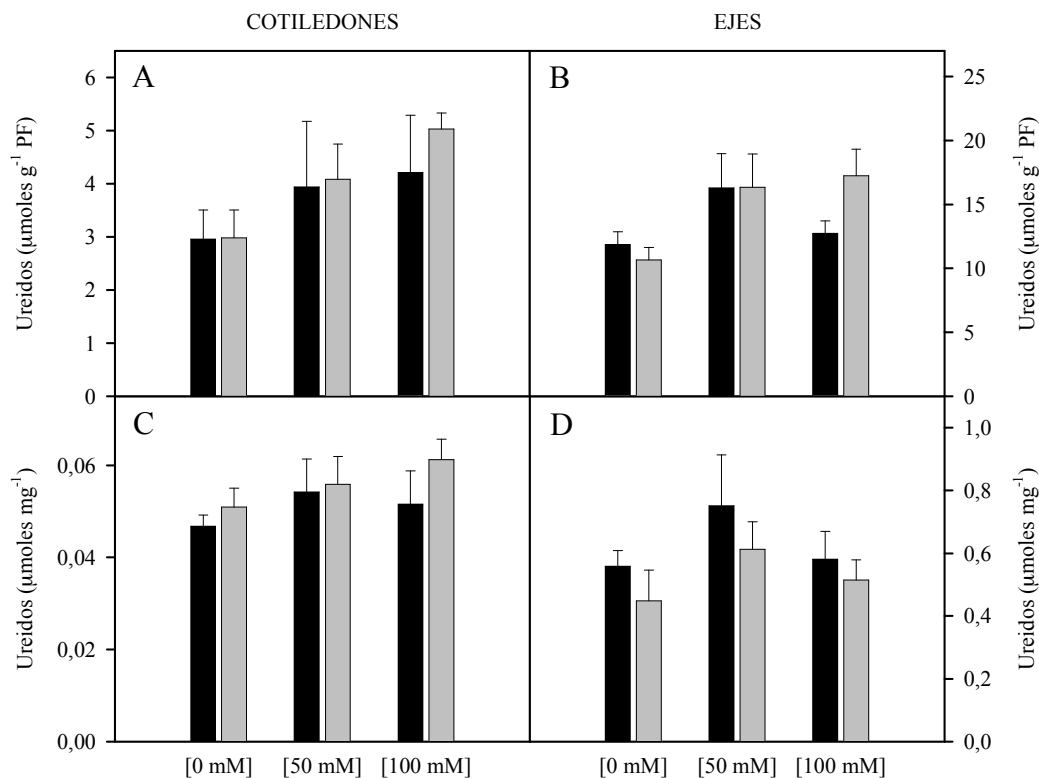
La salinidad es uno de los factores de estrés más común y que afecta a la germinación (Abogadallah y Quick 2009; Dasgan y Koc 2009; Voigt et al. 2009). La inclusión de cloruro sódico en el medio de imbibición afectó al desarrollo de las plántulas de judía (Figura 19-A). Concentraciones de NaCl de hasta 150 mM no afectaron a la tasa de germinación mientras que las semillas sometidas a 200 mM de NaCl presentaron una tasa muy pequeña de germinación y las que germinaron apenas desarrollaron la radícula (Figura 19-A). El desarrollo post-germinativo de las plántulas de judía se redujo en función de la concentración de sal a partir de 50 mM (Figura 19-A).



**Figura 19. Efecto de NaCl sobre la germinación y desarrollo inicial de plántulas de judía.** (A) Fotografías de plántulas de judía de 8 días embebidas en presencia de las concentraciones de NaCl indicadas. (B) Peso fresco de los ejes embrionarios a los 6 (barras negras) y 8 (barras grises) DDI de plántulas desarrolladas en presencia de NaCl 0, 50 y 100 mM.

El peso fresco de los ejes embrionarios a los 6 DDI se redujo de forma similar en plántulas desarrolladas en presencia de 50 y 100 mM de sal (Figura 19-B). A partir de este momento, el efecto fue distinto; con 50 mM de NaCl, el peso fresco del eje se duplicó en las siguientes 48 horas, como sucedió con los ejes de plántulas en ausencia de sal, mientras que 100 mM de NaCl impidió este incremento de peso fresco (Figura 19-B).

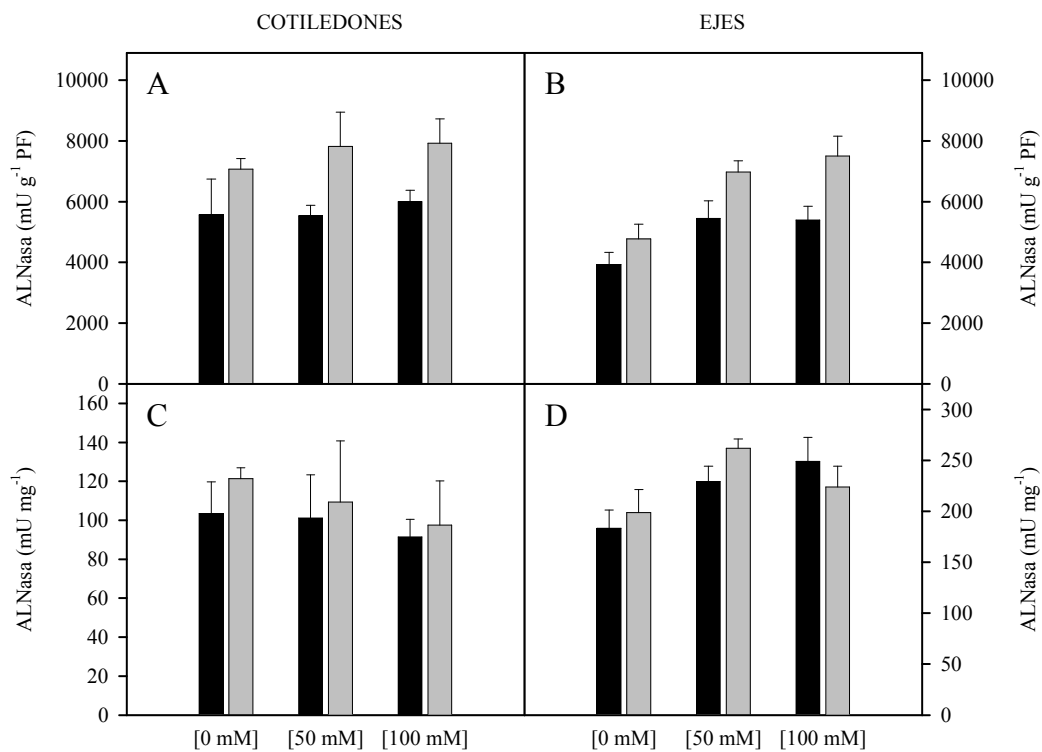
Se estudió el efecto de la presencia de 50 y 100 mM de NaCl en el medio de imbibición sobre el nivel de ureidos (Figura 20) y la actividad alantoinasa (Figura 21) a los días 6 y 8 después de la imbibición.



**Figura 20.** Concentración de ureidos presentes en cotiledones y ejes de plántulas desarrolladas en presencia de 50 y 100 mM de NaCl. Plántulas de judía se desarrollaron desde el inicio en presencia de 0, 50 y 100 mM de NaCl en el medio de imbibición. A los 6 (barras negras) y 8 (barras grises) DDI se separaron ejes y cotiledones, y se obtuvieron extractos a partir de estos tejidos. Se determinó la concentración de ureidos en estos extractos representándose en función del peso fresco ( $\mu\text{moles g}^{-1}$  PF) y la concentración de proteína soluble ( $\mu\text{moles mg}^{-1}$ ).

Las plántulas desarrolladas en presencia de NaCl tenían una mayor concentración de ureidos por peso fresco tanto en cotiledones como en ejes en desarrollo (Figura 20-A y B). Este incremento en la concentración de ureidos fue inferior o desapareció cuando los valores de ureidos se expresaron por mg de proteína (Figura 20-C y D). Así, en ejes en desarrollo, la concentración de ureidos por mg de proteína fue superior únicamente con 50 mM de NaCl, mientras que los valores fueron similares en el caso de 100 mM.

La actividad alantoinasa en estos extractos presentó mayores valores en ejes en desarrollo tanto si se refirió por g de peso fresco como por mg de proteína soluble total, mientras que la actividad apenas se vio afectada en los extractos obtenidos a partir de cotiledones (Figura 21).



**Figura 21.** Actividad alantoinasa en cotiledones y ejes de plántulas desarrollados en presencia de NaCl 50 y 100 mM. En los mismos extractos indicados en la Figura 20 se determinó la actividad alantoinasa, representándose en función de la concentración de proteína soluble ( $\mu\text{moles mg}^{-1}$ ) y del peso fresco ( $\mu\text{moles g}^{-1}$  PF). Barras negras indican extractos obtenidos a partir de plántulas de 6 días de desarrollo y barras grises extractos obtenidos a partir de plántulas de 8 días.

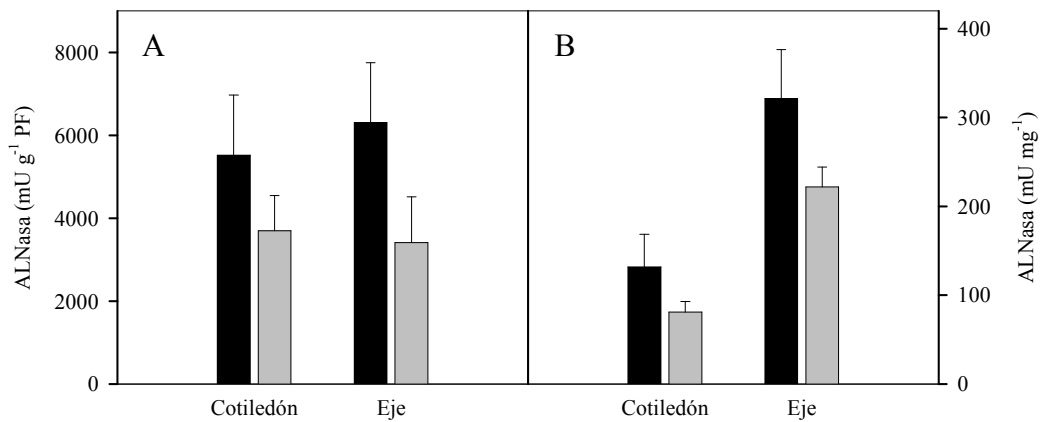
### 1.9.- Efecto de la etiolización en la cantidad de ureidos y actividad alantoinasa.

El desarrollo post-germinativo de judía en ausencia de luz dio lugar al fenotipo normal de etiolización: hipocótilos engrosados, mayor desarrollo de los ejes embrionarios y ausencia de clorofilas (Tabla 3). La concentración de ureidos fue inferior en cotiledones y ejes embrionarios de plántulas desarrolladas en condiciones de etiolización (Tabla 3). El contenido total de ureidos por par de cotiledones fue también inferior en plántulas etioladas mientras que el contenido total por eje embrionario fue similar al tener un mayor desarrollo los ejes de plántulas etioladas (Tabla 3).

La actividad que cataliza la degradación de alantoína fue inferior en los extractos obtenidos a partir de plántulas etioladas, tanto en cotiledones como en ejes (Figura 22).

**Tabla 3. Efecto de la etiolización en el desarrollo y concentración de ureidos en plántula de judía.** Plántulas de judía se desarrollaron en condiciones estándar o ausencia de luz, y a los 6 días de desarrollo se separaron en ejes y cotiledones. El contenido de clorofila y de ureidos se determinó en los extractos obtenidos.

Tejido	Tratamiento	Peso (g)	Clorofilas ( $\mu\text{g gPF}^{-1}$ )	Ureidos $\mu\text{moles gPF}^{-1}$	Ureidos $\mu\text{moles unidad}^{-1}$
Cotiledones	Control	0,566 $\pm$ 0,027	18,9 $\pm$ 9,8	3,158 $\pm$ 0,704	1,784 $\pm$ 0,394
	Etiolado	0,496 $\pm$ 0,032	0 $\pm$ 0	2,381 $\pm$ 0,265	1,182 $\pm$ 0,146
Ejes	Control	0,233 $\pm$ 0,073	77,1 $\pm$ 19,1	8,477 $\pm$ 1,887	1,893 $\pm$ 0,323
	Etiolado	0,279 $\pm$ 0,123	0 $\pm$ 0	6,592 $\pm$ 1,484	1,708 $\pm$ 0,412



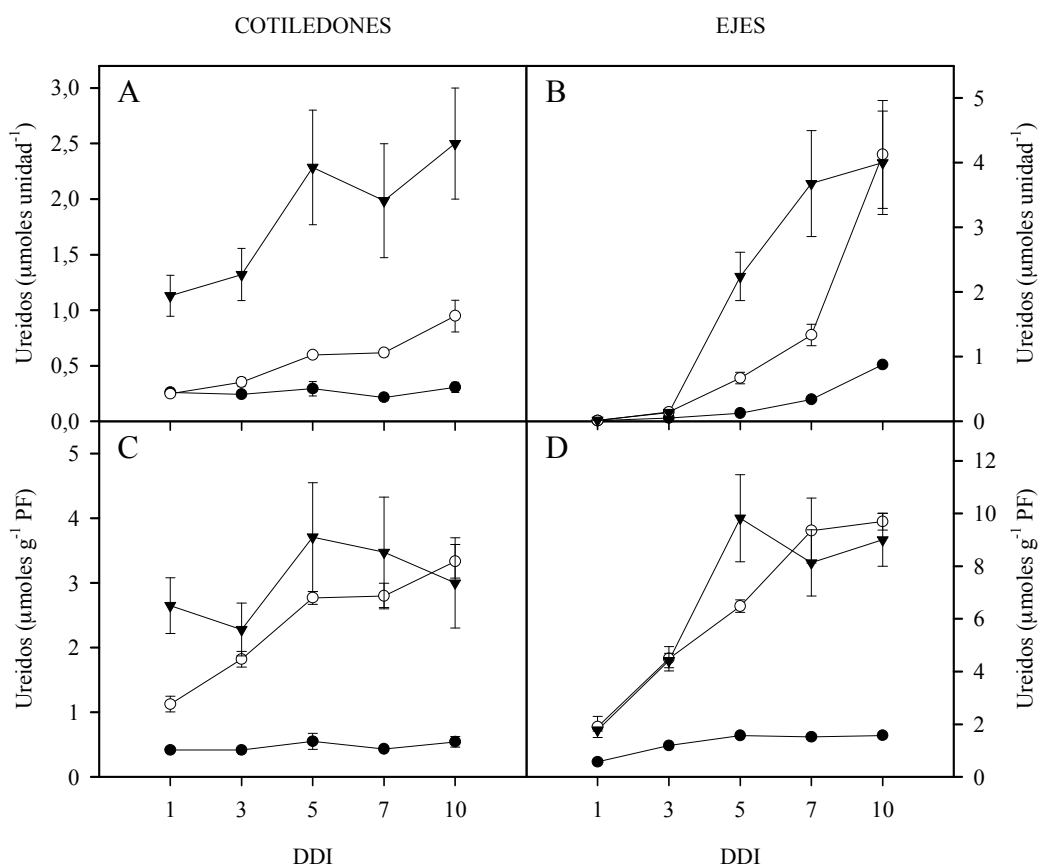
**Figura 22.** *Actividad alantoinasa en cotiledones y ejes de plántulas etioladas.* En los mismos extractos analizados en la Tabla 3 se determinó la actividad que cataliza la degradación de la alantoína y se expresó frente a g de peso fresco (A) o mg de proteína soluble (B). Barras negras representan los datos de plántulas desarrolladas en condiciones estándar y barras grises en condiciones de etiolización.

### 1.10.- Metabolismo de ureidos durante germinación y posterior desarrollo inicial en otras especies de leguminosas.

El metabolismo de ureidos durante el desarrollo post-germinativo se estudió en otras leguminosas como soja y garbanzo, y se comparó con judía. Al expresar los valores de ureidos frente a unidad de tejido, los cotiledones de judía, tras un día de imbibición, presentaron mayores valores de ureidos que los de soja y garbanzo (Figura 23-A). En soja, se observó acumulación de ureidos por unidad de eje y cotiledón a lo largo del desarrollo de la plántula mientras que en garbanzo solo una ligera acumulación en ejes a lo largo del desarrollo (Figura 23-A y B). Al referir la cantidad de ureidos a gramo de peso fresco de tejido, se observó una tendencia similar en soja y judía tanto en cotiledones como en ejes y con unos valores también muy semejantes, mientras que los valores de ureidos

en cotiledones y ejes de garbanzo permanecieron en los valores bajos e insignificantes con respecto a los de las otras plántulas (Figura 23-C y D).

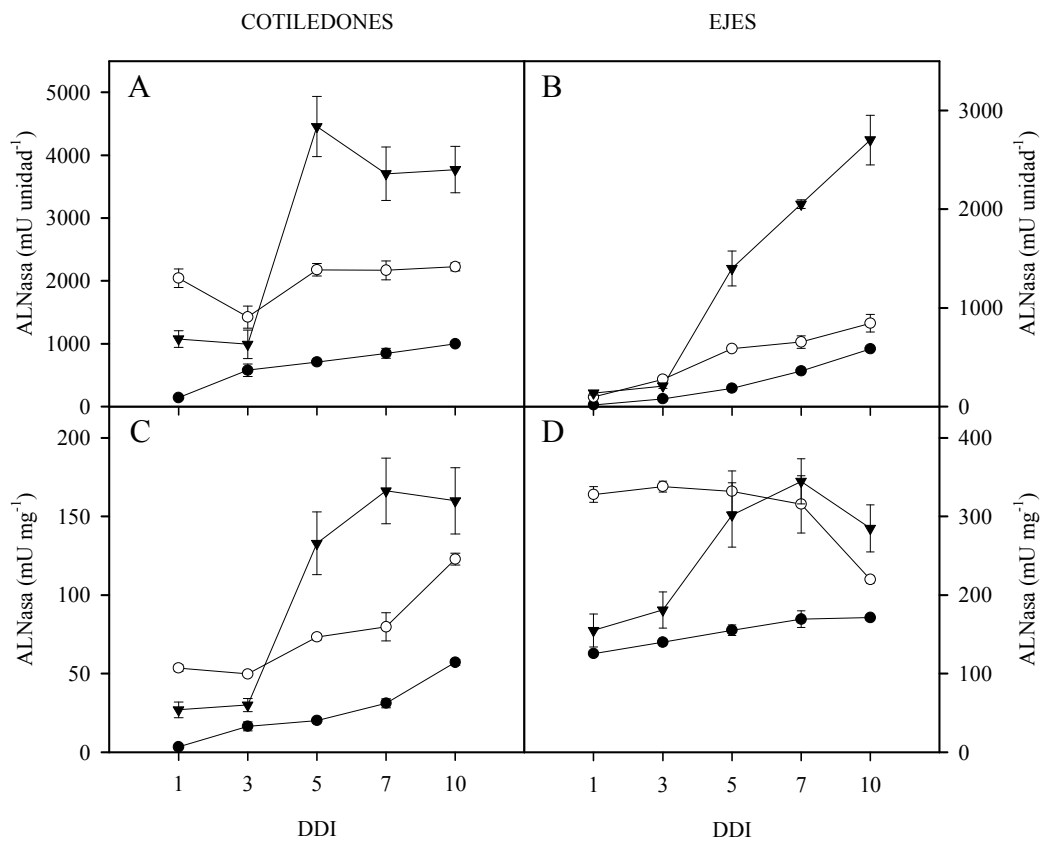
En los mismos extractos acelulares, se determinó la actividad alantoinasa (Figura 24). En cotiledones, se detectó dicha actividad en las tres especies tras 1 día de imbibición, aunque la mayor actividad se encontró en soja (Figura 24-A y C). En las tres especies se produjo inducción de la actividad en cotiledones a lo largo del desarrollo, presentando la mayor actividad en judía y la menor en garbanzo (Figura 24-A y C).



**Figura 23. Concentración de ureidos en cotiledones y ejes de varias leguminosas.** Semillas de garbanzo ( $\bullet$ ), soja ( $\circ$ ) y judía ( $\blacktriangledown$ ), se germinaron en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Se obtuvieron extractos crudos de cotiledones y ejes para los días después de la imbibición (DDI) indicados y se determinó la concentración de ureidos en los mismos y se refirieron a unidad de tejido (A y B) o a g de peso fresco (C y D).



La actividad alantoinasa también fue mayor en los ejes en desarrollo en soja y judía que en garbanzo (Figura 24-B y D). El mayor incremento de actividad por unidad de tejido se observó en ejes de judía (B). Al expresar los valores de actividad por mg de proteína soluble (D), se observó una tendencia distinta en soja y judía: una elevada actividad inicial en soja que se mantuvo constante hasta 7 DDI para descender a partir de ese momento frente a un incremento inicial seguido de un descenso en judía, también a partir del 7 DDI.



**Figura 24. Actividad alantoinasa en cotiledones y ejes de varias leguminosas.** Semillas de garbanzo (●), soja (○) y judía (▼) se germinaron en las condiciones descritas en *Materiales y Métodos*. Se obtuvieron extractos crudos de cotiledones y ejes para los días después de la imbibición (DDI) indicados y se determinó la actividad alantoinasa en los mismos; los datos se refieren a unidad de tejido (A y B) o a g de peso fresco (C y D).

**2.- EXPRESIÓN DE UNA ALANTOINASA DE JUDÍA EN *E. coli*.  
OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS Y DETECCIÓN EN TEJIDOS DE  
JUDÍA**

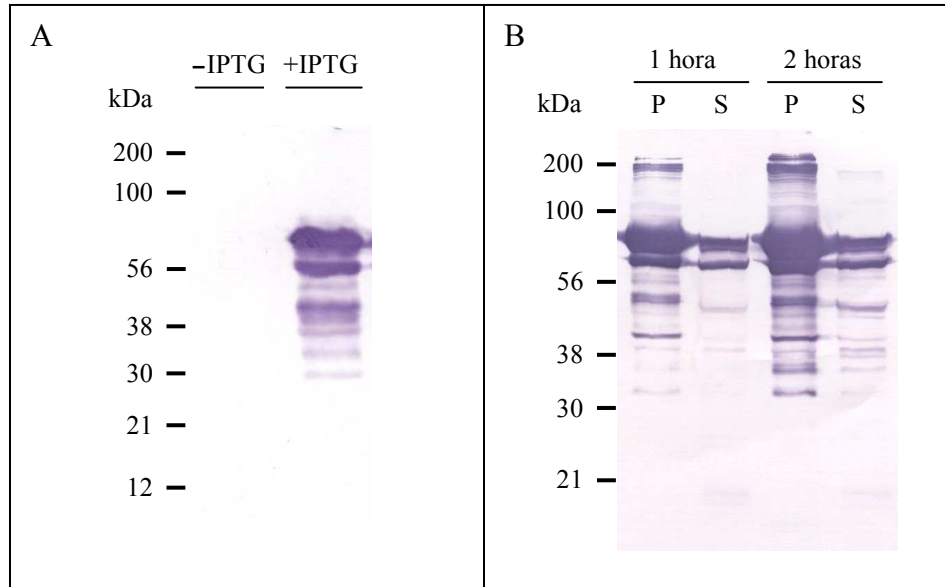


### **2.1.- Expresión heteróloga de un ADNc que codifica una alantoinasa de *Phaseolus vulgaris*.**

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha depositado en las bases de datos dos secuencias de ADNc, JQ282796 (*ALN1*) y JQ277455 (*ALN2*), que codifican una actividad alantoinasa, presentando *ALN2* niveles bajos de expresión frente a *ALN1* (Díaz-Leal et al. 2012). Se procedió a sobreexpresar la proteína codificada por el gen *ALN1*. En la secuencia de este gen se han descrito dos posibles marcos abiertos de lectura (Raso 2008). El primero codifica una proteína de 56 kDa que incluye una secuencia señal de transporte hacia la ruta de secreción y el segundo codifica una proteína sin péptido señal de 45 kDa. La expresión de la proteína codificada por el segundo marco abierto de lectura se llevó a cabo en *E. coli* utilizando el procedimiento que se describe en Materiales y Métodos. La proteína recombinante presentará una cola de histidinas en el extremo amino terminal para su detección mediante la técnica de Western blot y su purificación mediante cromatografía de afinidad a Ni<sup>+2</sup>.

Varios de los clones obtenidos se secuenciaron y se comprobó que la fase de lectura era la correcta y no se habían producido mutaciones durante el proceso de clonación. En todos estos clones se encontró el mismo perfil de expresión de la proteína recombinante Hys-PvALN. El análisis mediante la técnica de Western blot reveló la expresión de varias proteínas con colas de histidinas tras la inducción de las células de *E. coli* con IPTG mientras que no se observó expresión en células no inducidas (Figura 25-A). La proteína mayoritaria tiene un peso molecular aparente de 61 kDa que es ligeramente superior al esperado de 51 kDa. Las proteínas de menor masa molecular podrían corresponder a proteínas degradadas o truncadas. Con el objetivo de disminuir el porcentaje de proteínas de baja masa molecular, se analizó la expresión de la proteína recombinante en células de *E. coli* inducidas a 30 °C con IPTG 1mM durante 1 y 2 horas (Figura 25-B). La proteína recombinante se detectó tanto en la fracción soluble como insoluble aunque la mayor parte se encontró como

proteína insoluble en los precipitados (Figura 25-B). La cantidad de proteína soluble fue similar en ambos tiempos de inducción, mientras que la cantidad de proteína insoluble fue mayor tras 2 horas de inducción (Figura 25-B).

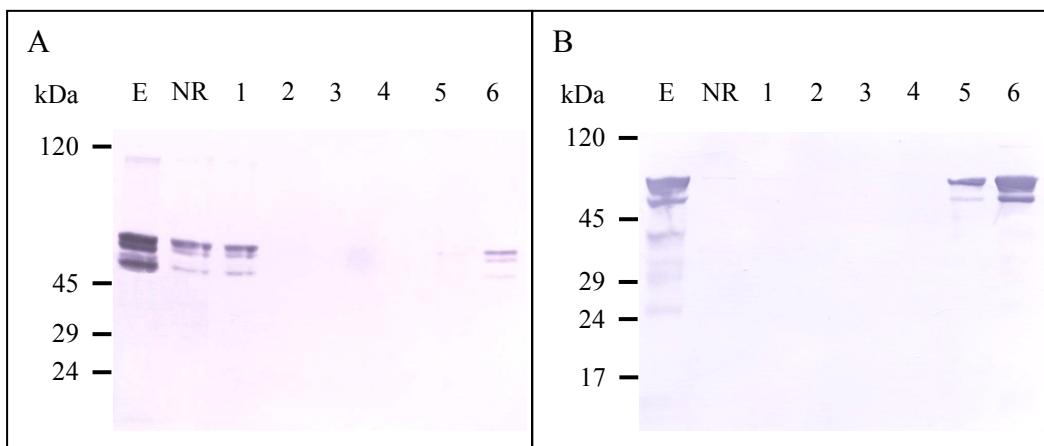


**Figura 25. Estudio de la inducción de la proteína recombinante Hys-PvALN mediante Western blot. (A) Expresión.** Una cepa de *E. coli* que contenía el plásmido de expresión de la proteína recombinante Hys-PvALN se cultivó como se indica en *Materiales y Métodos* hasta alcanzar la densidad óptica de 0,5. El cultivo se dividió en dos partes y a una de ellas se añadió IPTG. Las células de ambos cultivos se recogieron tras 2 horas a 37 °C y se rompieron mediante sonicación. Los extractos crudos obtenidos se analizaron mediante la técnica de Western blot utilizando anticuerpos frente a las colas de histidinas. **(B) Solubilidad.** La misma cepa se cultivó hasta una densidad óptica de 0,5 como anteriormente. El cultivo se dividió en dos partes y se indujeron con 1 mM IPTG, a 30 °C y durante 1 o 2 horas. Las células se recogieron y rompieron mediante sonicación en condiciones no desnaturizantes. El homogenado se centrifugó y se separó en precipitado (P) y sobrenadante (S). Los precipitados se resuspendieron en el mismo volumen de tampón para mantener las proporciones. En estas fracciones se analizó la expresión de la proteína recombinante mediante la técnica de Western blot utilizando anticuerpos frente a las colas de histidinas.

## 2.2.- Purificación de la proteína recombinante.

El proceso de purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en Chelating-Sepharose cargada con  $\text{Ni}^{+2}$  como se indica en el apartado de *Materiales y Métodos*. En condiciones no desnaturizantes, se utilizó como extracto crudo la fracción soluble, descartándose la insoluble formada por los

cuerpos de inclusión. En estas condiciones, la proteína recombinante presentó mala adhesión a la columna y la mayor parte de la proteína recombinante se obtuvo en la fracción no retenida a la columna (Figura 26-A calle NR). La proteína retenida se eluyó con tampón que contenía imidazol 500 mM y representó un porcentaje muy bajo con respecto a la presente en el extracto crudo (Figura 26-A calle 6). En condiciones desnaturalizantes, la purificación se llevó a cabo utilizando extracto crudo total, es decir, con proteína soluble y cuerpos de inclusión, en presencia de urea 8 M en los tampones. En estas condiciones, no se observó proteína en la fracción no retenida en la columna (Figura 26-B calle NR); la proteína retenida se eluyó utilizando imidazol 300 mM (Figura 26-B calles 5 y 6). La proteína eluida estaba purificada a

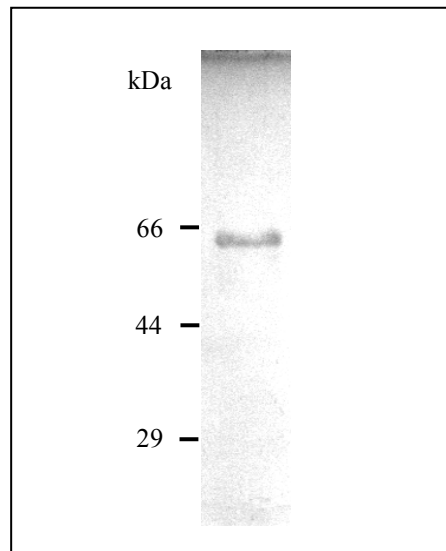


**Figura 26. Análisis mediante Western blot del proceso de purificación de la proteína recombinante Hys-PvALN por cromatografía de afinidad.**

**(A) Condiciones no desnaturalizantes.** El proceso se detalla en Materiales y Métodos. En la calle E se cargó el extracto crudo obtenido por centrifugación del homogenado tras romper las células de *E. coli* inducidas por IPTG mediante sonicación. La calle NR se cargó con el extracto no retenido en la columna. En las calles 1, 2, 3 y 4 se cargaron las fracciones obtenidas tras lavar sucesivamente la columna con tampón que contenía imidazol 100 mM. Las calles 5 y 6 se cargaron con las fracciones obtenidas tras lavar con tampón de elución que contenía imidazol 500 mM.

**(B) Condiciones desnaturalizantes.** El proceso se detalla en Materiales y Métodos. En la calle E se cargó el extracto crudo obtenido por centrifugación del homogenado tras romper las células de *E. coli* inducidas por IPTG mediante sonicación en tampones que contenían urea 8 M. La calle NR se cargó con el extracto no retenido en la columna. En las calles 1 y 2, y en las 3 y 4, se cargaron las fracciones obtenidas tras lavar la columna con tampones que contenían imidazol 25 y 40 mM, respectivamente. Las calles 5 y 6 se cargaron con las fracciones obtenidas tras lavar con tampón de elución que contenía imidazol 300 mM.

homogeneidad electroforética (Figura 27), por lo que se utilizó este método de purificación en condiciones desnaturalizantes para la obtención de gran cantidad de proteína pura. La proteína pura no mostró actividad alantoinasa y no se consiguió actividad tras diversos tratamientos (incubación con manganeso, con DTT, con glutatión, etc.).



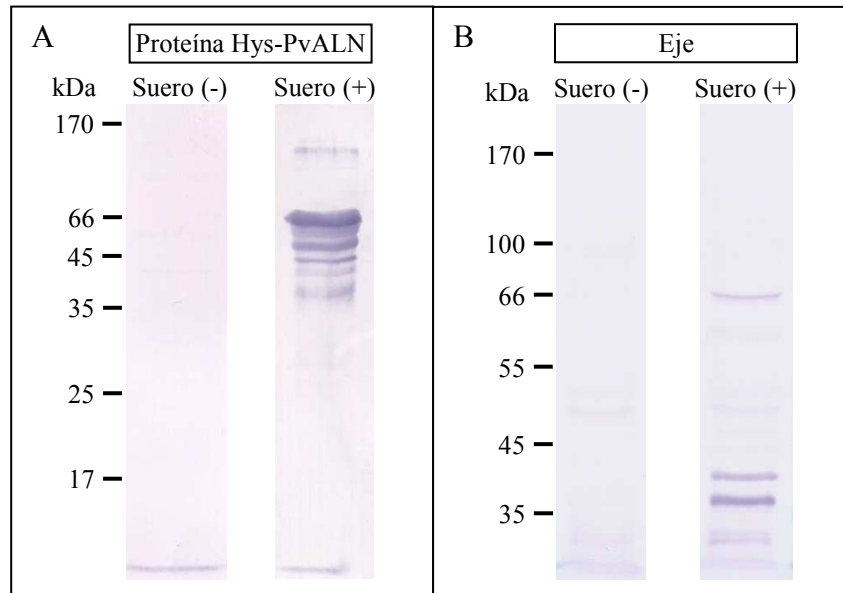
*Figura 27. Análisis mediante SDS-PAGE de la proteína recombinante Hys-PvALN purificada. La proteína purificada en condiciones desnaturalizantes se dializó frente a tampón salino y se resolvió mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. El gel se tiñó con Coomassie un paso.*

### **2.3.- Estudios inmunológicos.**

#### **2.3.1.- Anticuerpos policlonaes frente a la proteína recombinante Hys-PvALN.**

La proteína de fusión Hys-PvALN purificada se usó para obtener anticuerpos policlonaes en conejos. El suero post-inmune obtenido reconoció la proteína recombinante Hys-PvALN utilizada en la inmunización, mientras que no se obtuvo ninguna señal utilizando el suero pre-inmune (Figura 28-A). Estos mismos sueros se utilizaron en el análisis Western blot de los extractos crudos obtenidos a partir de ejes de plántulas de judía (Figura 28-B). Se obtuvieron varias bandas específicas utilizando el suero post-inmune que no se observaron con el suero pre-inmune. La masa molecular de la banda superior podría corresponder con la masa molecular esperada para la proteína deducida a partir

de su secuencia nucleotídica de la alantoinasa de judía, mientras que las dos de menor tamaño correspondieron con las dos proteínas purificadas anteriormente (Raso et al. 2007b).



**Figura 28. Análisis mediante Western blot utilizando los anticuerpos policlonales obtenidos.** Proteína recombinante (A) y extracto crudo de ejes de judía (B) se resolvieron en SDS-PAGE 10% y 8,5%, respectivamente. A continuación se analizaron mediante Western blot utilizando suero pre-inmune (Suero (-)) e inmune (Suero (+)). El suero pre-inmune se utilizó en una relación de 1:250 en ambos casos. El suero post-inmune se utilizó en una relación 1:250 frente a la proteína Hys-PvALN y en una relación de 1:2500 frente a extracto de eje.

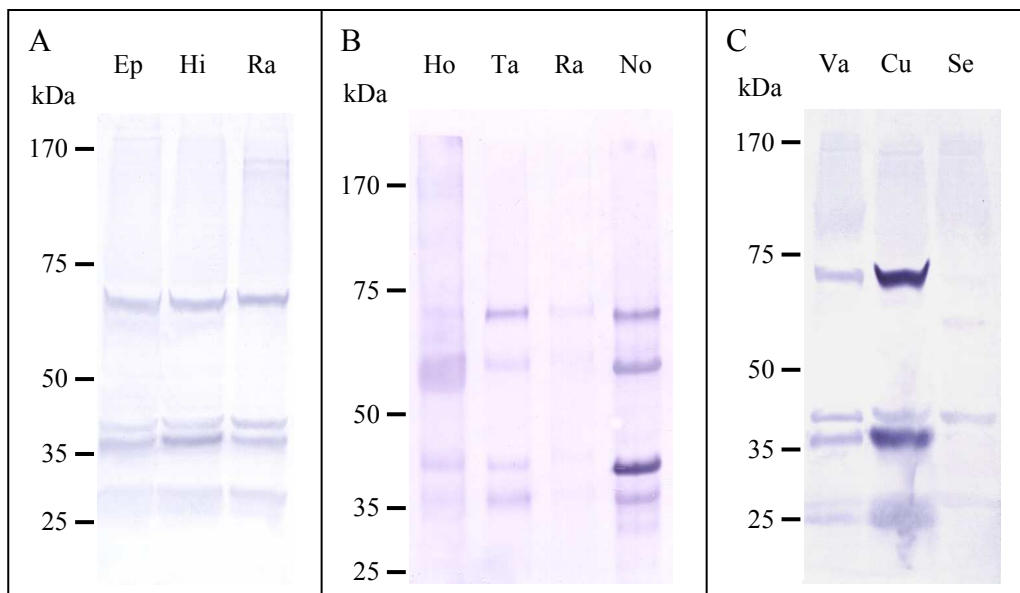
### 2.3.2.- Análisis de expresión de alantoinasa en distintos tejidos mediante Western blot.

El análisis de expresión en diferentes tejidos y etapas de desarrollo de judía se realizó mediante Western blot con anticuerpos policlonales frente a la proteína heteróloga Hys-PvALN.

Las tres proteínas reconocidas por los anticuerpos policlonales indicadas previamente se detectaron en las distintas partes de los ejes de plántulas de judía



a los seis días de desarrollo (epicótilo, hipocótilo y raíz) y la abundancia relativa fue similar, aunque la proteína de menor masa molecular fue ligeramente superior en epicótilo e hipocótilo (Figura 29-A). En distintas partes de plantas adultas (hojas, tallos, raíces y nódulos) cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno y analizadas a los 35 días de desarrollo, se detectaron estas tres bandas con diferente intensidad relativa (Figura 29-B). Se observó la reactividad con los anticuerpos de una nueva proteína con masa molecular aproximada de 50 kDa fundamentalmente en hojas, tallos y nódulos. En este último tejido la abundancia relativa de esta nueva proteína es superior a la que se observó en los otros tejidos.



**Figura 29. Análisis de expresión de la allantoinasa en diferentes tejidos en judía.** Los extractos crudos obtenidos a partir del tejido que se indica se analizaron mediante Western blot utilizando los anticuerpos policlonales obtenidos. La carga se realizó en cada calle por peso fresco de tejido.

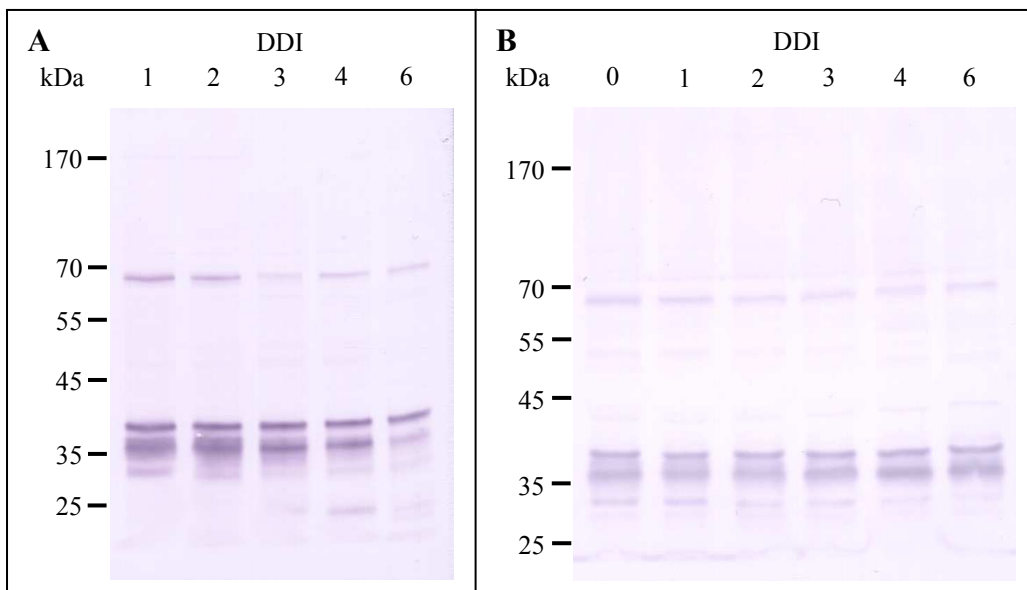
**(A) En ejes de plántulas de 6 días.** Los ejes se dividieron en epicótilo (Ep), hipocótilo (Hi) y raíz (Ra).

**(B) En planta adulta.** Los extractos se obtuvieron a partir de hojas (Ho), tallos (Ta), raíces (Ra) y nódulos (No) de plantas de 35 días, cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno.

**(C) Partes de fruto en desarrollo.** Los extractos se obtuvieron a partir vainas (Va), cubiertas (Cu) y semillas (Se) de frutos en desarrollo provenientes de plantas cultivadas en condiciones de fijación.

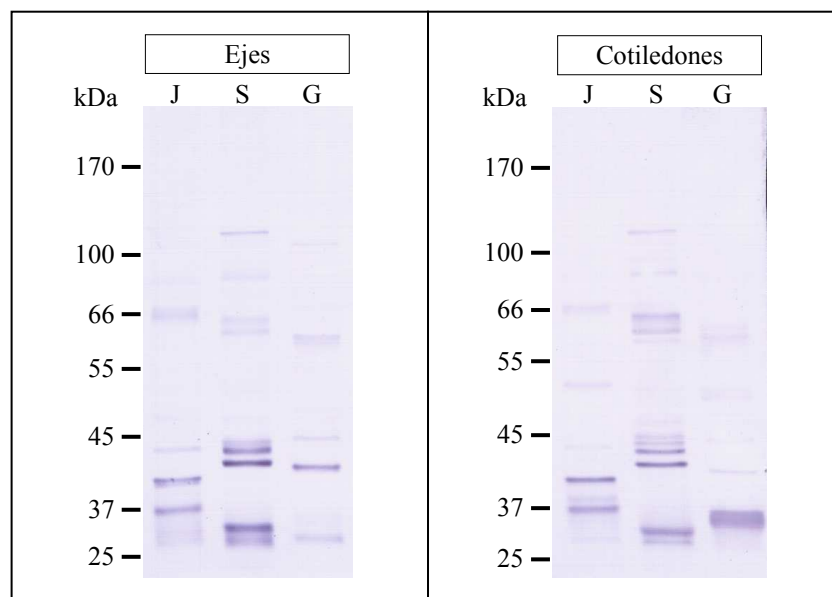
También se analizaron los extractos obtenidos a partir de vainas, cubiertas y semillas de frutos en desarrollo (Figura 29-C). De nuevo se detectaron las proteínas inmunoreactivas ya descritas. La banda de 40 kDa presentó una intensidad muy similar en los tres tejidos, aparte de ser la única detectada en semillas en formación. Las otras dos proteínas de 66 y 37 kDa fueron mucho más abundantes en cubiertas (Figura 29-C).

La distribución relativa de estas proteínas se analizó en ejes y cotiledones de judía durante la germinación y desarrollo post-germinativo (Figura 30). Las tres proteínas se detectaron en ejes en desarrollo de 1 día, así como en cotiledones de semillas secas, y la abundancia relativa de las proteínas no varió significativamente a lo largo del desarrollo. Puesto que la cantidad cargada en cada calle fue similar en referencia al peso fresco, se puede deducir que las proteínas en ejes disminuyeron a lo largo del desarrollo, lo que se aprecia por el descenso en la intensidad de las bandas.



**Figura 30.** *Análisis de expresión de la alantoinasa de judía durante la germinación y desarrollo post-germinativo.* Extractos obtenidos a partir de ejes (A) y cotiledones (B) a los días tras inicio de la imbibición (DDI) indicados, se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos policlonales generados frente a la proteína Hys-PvALN. La carga en cada pocillo se realizó frente a peso fresco.

Los anticuerpos policlonales obtenidos frente a la proteína de judía se han utilizado en el análisis mediante Western blot de extractos crudos de ejes y cotiledones de soja y garbanzo (Figura 31). En todos los casos se obtuvieron múltiples bandas de inmunoreactividad tanto en ejes como en cotiledones. Al igual que en judía, las bandas de mayor intensidad obtenidas en extractos crudos de ejes de soja corresponden a proteínas de baja masa molecular (30, 42 y 44 kDa) aunque también se observó inmunoreactividad con proteínas de mayor masa molecular (de 62 a más de 120 kDa, aproximadamente).



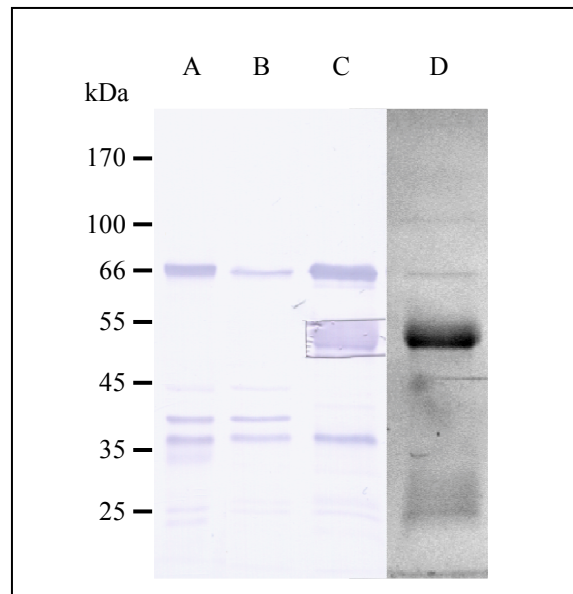
**Figura 31.** Análisis de expresión de la alantoinasa en ejes y cotiledones de judía, soja y garbanzo. Plántulas de judía (J), soja (S) y garbanzo (G) de 7 días de desarrollo se separaron en ejes y cotiledones. Los extractos obtenidos a partir de estos tejidos se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos policlonales obtenidos. La carga se realizó en cada calle por peso fresco de tejido.

#### **2.4.- Purificación mediante inmunoprecipitación e identificación de la proteína de 66 kDa por la técnica MALDI-TOF/TOF.**

Como se observa en todos los tejidos de judía, los anticuerpos policlonales desarrollados en conejo frente a la proteína recombinante reconocen tres

proteínas en extractos crudos de judía mediante análisis de Western blot. Las proteínas de menor masa molecular correspondieron con las proteínas purificadas anteriormente en judía (Raso et al. 2007b). Sin embargo, la proteína de 66 kDa no se había descrito anteriormente y podría corresponder también a la alantoinasa puesto que su masa molecular es muy similar a la deducida a partir del gen. Esta proteína se detectó mediante Western blot únicamente en extractos desnaturalizados mediante calor y agente reductor por lo que el proceso de inmunoprecipitación se llevo a cabo tras someter a los extractos crudos a este tratamiento. La inmunoprecipitación se realizó con extractos de cubiertas de semillas de frutos ya que fue donde la intensidad de la banda correspondiente a esta proteína fue mayor. El análisis mediante Western blot del proceso de inmunoprecipitación reveló que los anticuerpos precipitan, en las condiciones ensayadas, la proteína de 66 kDa junto con la proteína mas pequeña (Figura 32-C). La tinción del gel con coomassie demostró que la proteína de 66 kDa fue la mayoritaria en el inmunoprecipitado junto con la correspondiente a los anticuerpos (Figura 32-D).

La fracción del gel que contenía a la proteína de 66 kDa se recortó y se determinó la huella peptídica, como se indica en Materiales y Métodos. Los datos obtenidos se introdujeron en el motor de búsqueda MASCOT y se obtuvo la información que se indica en la Tabla 4. El término Puntuación de la proteína se definen como  $-10*\text{Log}(P)$ , siendo P la probabilidad de que la equivalencia establecida entre la proteína problema y la obtenida de la base de datos sea un evento aleatorio. La proteína de 66 kDa se emparejó con la proteína alantoinasa de *Robinia pseudoacacia* con un valor de puntuación de la proteína de 116, considerándose como significativos ( $p < 0,05$ ) valores superiores a 71 (Tabla 4). Con un valor inferior al de significación se identificó la proteína problema como una dihidroorotasa de *Medicago truncatula*.



**Figura 32. Purificación mediante inmunoprecipitación de la proteína de 66 kDa.** (A-C) análisis mediante Western blot del proceso de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos policlonales generados frente a la proteína Hys-PvALN. En (A) se cargó la proteína presente en el extracto crudo, en (B) la proteína no unida a anticuerpo y en (C) la proteína precipitada. En la calle (D) se muestra la tinción de Coomassie correspondiente a la proteína precipitada. C y D contienen la misma cantidad de proteína.

**Tabla 4. Resultados de la identificación por huella peptídica (MALDI-TOF).** La proteína precipitada con los anticuerpos obtenidos frente a la proteína Hys-PvALN se recortó del gel tras separación mediante SDS-PAGE. La proteína contenida en el fragmento del gel se analizó mediante huella peptídica.

	Nombre	Especie	Masa teórica (kDa)/ pI	Puntuación de la proteína	Expect:	Péptidos que se ajustan	Cobertura de secuencia %	Nº acceso
A	Alantoinasa	<i>Robinia pseudoacacia</i>	56,61 / 5,36	116	1.8 e-6	6	8	gi 39653353
B	Dihidroorotasa	<i>Medicago truncatula</i>	55,62 / 5,29	66	0,17	4	5	gi 124360607

De los péptidos obtenidos tras digestión de la proteína con tripsina y determinados por MALDI-TOF, 6 se ajustaron en sus masas a los descritos para

la alantoinasa de Robinia completando un 8% de la secuencia. Dos de estos fragmentos (A y B) fueron analizados por MS/MS aportando una Puntuación de ión de 56 y 40, respectivamente (Tabla 5). El término puntuación de ión se define como  $-10 \cdot \log(P)$ , siendo P la probabilidad de que la equivalencia establecida entre la proteína problema y la obtenida de la base de datos sea un evento aleatorio. Para el péptido A, el algoritmo calculó un valor de referencia de 44 a partir del cual se consideró como péptidos idénticos ( $p < 0,05$ ). Este valor, en el caso del péptido B, descendió a 41 para indicar identidad y a 32 para altamente similar.

**Tabla 5. Resultados del análisis MS/MS.** A dos de los péptidos mayoritarios analizados por MALDI-TOF se les obtuvieron sus espectros de fragmentación (MS/MS) y los datos obtenidos se analizaron a través del motor de búsqueda MASCOT. El término Valor de referencia es el valor a partir del cual la secuencia obtenida se puede considerar idéntica (I) o altamente similar (S)

	Péptido	Peso observado	Peso calculado	Valor de referencia	Puntuación de ión	expect
1	VLDTFVR	849.48	848.48	43 (I)	56	0.0034
2	TEWEGFDTGTR	1298.56	1297.56	41 (I) 32 (S)	40	0.074

Las secuencias con mayor probabilidad obtenidas por el motor de búsqueda MASCOT se localizaron en la proteína ALN1 (Figura 33, secuencias subrayadas). Utilizando el software FindPept se emparejaron 8 de las masas obtenidas por MALDI con sus posibles secuencias en la proteína ALN1 (Figura 33, secuencias con fondo verde). Sin embargo, cuando se realizó con la secuencia de la proteína ALN2, el software solo localizó un único péptido.

El estado de glicosilación de la proteína de 66 kDa purificada mediante inmunoprecipitación y recorte en gel tras SDS-PAGE, se analizó mediante tratamiento con la enzima N-glicosidasa F y análisis posterior mediante Western blot (Figura 34). La masa molecular de la proteína descendió solamente 2-3 kDa

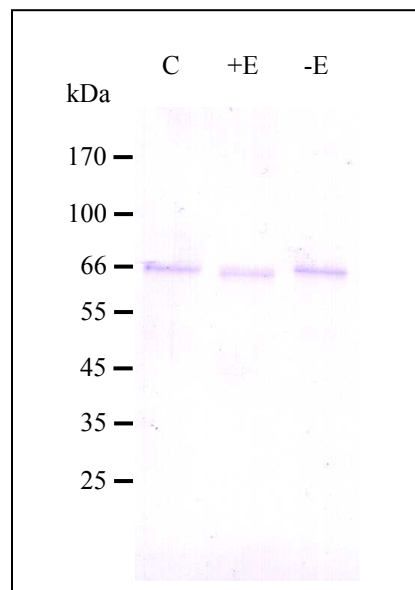
(Figura 34, +E) frente al control de purificación (Figura 34, C) y sin tratar (Figura 34, -E).

```

1-.MDQFIWRVLPPLLSILVSFLVFFYFQNSHTAQLYPLIKFPRSKCSLLPHHH.-50
51-.FWISSKRIVTPQGIISGSVEINEGRIVSVIEGYGKQGQSKQEEIIDYGDA.-100
101.-VVMPLGLIDVHVHLDEPGRTEWEGFDTGTRAAAAGGVTTVVDMPLNNYPST.-150
151.-VSKETLK LKLDAAEDK IYVDVGFWGGGLVPENALNLTILDDLLSAGVLGVK.-200
201.-SFMCPSGINDFPMTTIDHIKAGLSVLAKYKRPIVVHAELOQDYGNHLDIN.-250
251.-DNRDPHDYLTYNTRPPSWEEAAIRQLVGVSKDTGIGGPLEGAVHVHIVHL.-300
301.-SDSSASLDLIKEAKSRGDSITVETCPHYLAFTSEEIPNGDTRFKCSPPIR.-350
351.-DAHNKDKLWEAVLEGHIDLLTTDHSPVPELK LLEEGDFLKAWGGISLQ.-400
401.-FNLPV TWSYGKKYGLTLEQLSLLWSK RPAALAGIESKGTIEVGNHADIVV.-450
451.-WQPEQEFDLDDNYPVFIKHYELSAVMGRRLSGEVLDTFVRGNLVFKDEKH.-500
501.-APAACGVQILAT.....-512

```

**Figura 33. Localización de las secuencias identificadas por MALDI-TOF en la secuencia de la proteína ALN1.** Los fragmentos subrayados indican los péptidos identificados tras búsqueda en el motor MASCOT. En fondo verde, los péptidos identificados por el software FindPept utilizando las masas obtenidas por MALDI y la secuencia de la proteína ALN1 como base.



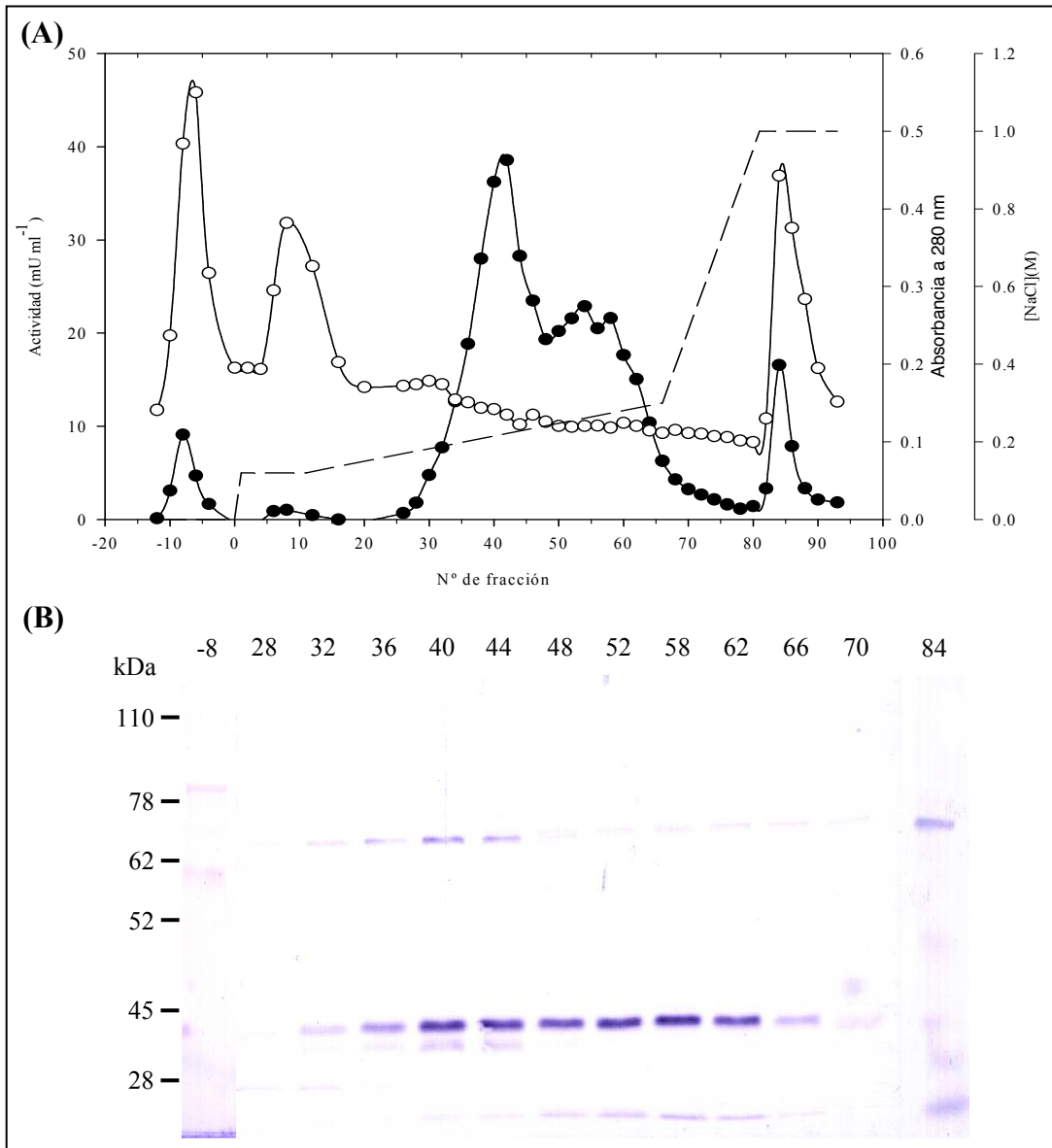
**Figura 34. Análisis del estado de glicosilación de la proteína de 66 kDa.** Proteína alantoinasa purificada por inmunoprecipitación y recorte en gel tras SDS-PAGE (C), se incubó en presencia (+E) y en ausencia (-E) de N-Glicosidasa F. Las reacciones se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos policlonales frente a la proteína de fusión Hys-PvALN.

### **2.5.- Cromatografía DEAE-Sephacel de extractos de frutos. Análisis mediante Western blot.**

La cromatografía de intercambio iónico en DEAE se había usado para separar las dos proteínas con actividad alantoinasa purificadas previamente (Raso et al. 2007b). Se analizaron por Western blot las fracciones con actividad alantoinasa obtenidas tras cromatografía DEAE-Sephacel de extractos obtenidos a partir de frutos en desarrollo (Figura 35). En el perfil cromatográfico se encontró cuatro picos con actividad alantoinasa (Figura 35-A línea continua). En la fracción de carga de la columna, aparece una pequeña cantidad de actividad alantoinasa no retenida en la columna. Los dos principales picos de actividad se separaron en el gradiente de NaCl (120 mM – 300 mM). Un cuarto pico apareció en el lavado final a 1000 mM de NaCl.

El primer pico de actividad en el gradiente presentó tres bandas: una de 64 kDa y dos inferiores de 40 kDa y 37 kDa. La banda superior presentó mayor intensidad en la fracción 40 correspondiendo con el máximo de actividad del pico, mientras que la de 40 kDa presentó mayor intensidad en las fracciones 40 y 44 (Figura 35-B). La banda de 37 kDa presentó menor intensidad que las dos superiores y se observó solo en este pico. El segundo presentó un máximo de actividad menos definido que el anterior observándose por Western blot una única banda de unos 40 kDa que, al igual que la actividad, presentó mayor intensidad en las fracciones 52, 58 y 62. La banda de 40 kDa se distribuyó por ambos picos presentando un punto de inflexión en la fracción 48 coincidiendo con la separación de los dos. El tercer y último pico presentó un máximo de actividad en la fracción 84. El análisis por Western blot de esta fracción generó una única banda de un peso aproximado de 66 kDa.





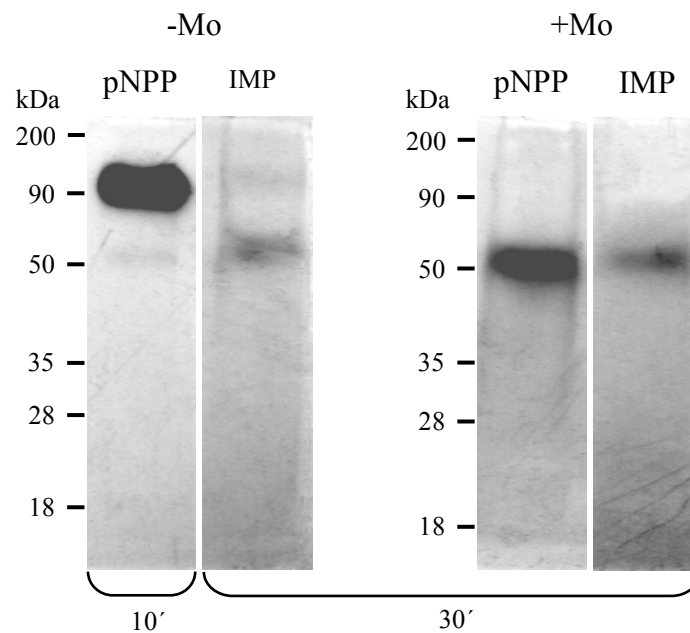
**Figura 35. Cromatografía en DEAE-Sepharose y Western blot de las fracciones obtenidas.** (A) El extracto crudo de fruto fue aplicado a la columna (9 x 2,6 cm) de DEAE-Sepharose. La cromatografía se realizó con tampón TRIS suplementado con las concentraciones de NaCl indicadas (--). Todo el proceso se realizó a un flujo de 1 ml/min y se recogieron fracciones de 2,5 ml, en las que se determinó la concentración total de proteína (absorbancia a 280 nm, (○)) y la actividad alantoinasa (●). (B) Se realizó un Western blot con las fracciones indicadas abarcando la carga (-8), los dos picos de actividad centrales de la cromatografía (28 a 70) y el tercer pico de actividad (84).

**3.- ACTIVIDADES FOSFATASAS DE NUCLEÓTIDOS DURANTE LA  
GERMINACIÓN Y POSTERIOR DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE  
JUDÍA**



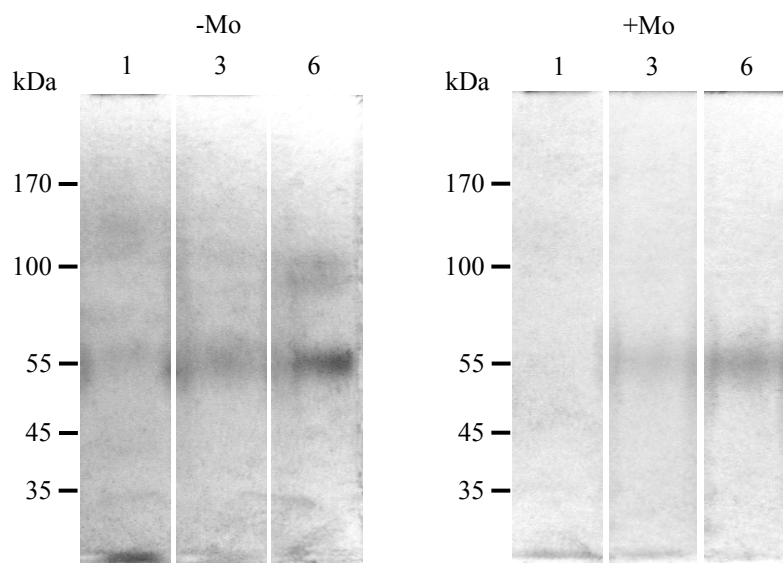
### 3.1.- Actividades fosfatasas en plántulas de *Phaseolus vulgaris*.

Las actividades fosfatasas se analizaron en extractos crudos obtenidos a partir de ejes de plántulas de judía de 8 días de desarrollo utilizando un ensayo de actividad en gel con IMP y p-nitrofenilfosfato (pNPP) como sustratos. Se detectaron dos actividades fosfatasas mayoritarias con masas moleculares de 110 y 55 kDa (Figura 36). En el ensayo de actividad con pNPP como sustrato, la actividad mayoritaria correspondió a la proteína de 110 kDa, mientras que con IMP la proteína de 55 kDa mostró mayor actividad. Las dos actividades enzimáticas se diferenciaron entre sí por su sensibilidad al molibdato: este anión inhibió completamente la actividad de la proteína de 110 kDa con ambos sustratos mientras que no afectó a la actividad de la proteína de 55 kDa (Figura 36).



**Figura 36.** Actividades fosfatasas ácidas en ejes de plántulas de judía. Las actividades fosfatasas se determinaron en extractos de ejes de judía de 8 días de desarrollo mediante el ensayo en gel (SDS-PAGE) frente a p-nitrofenilfosfato (pNPP) o IMP como sustratos (5 mM en ambos casos) y en ausencia (-Mo) o presencia (+Mo) de molibdato sódico 5 mM. Las reacciones se pararon a los 10 min para pNPP -Mo y a los 30 min para el resto de sustratos.

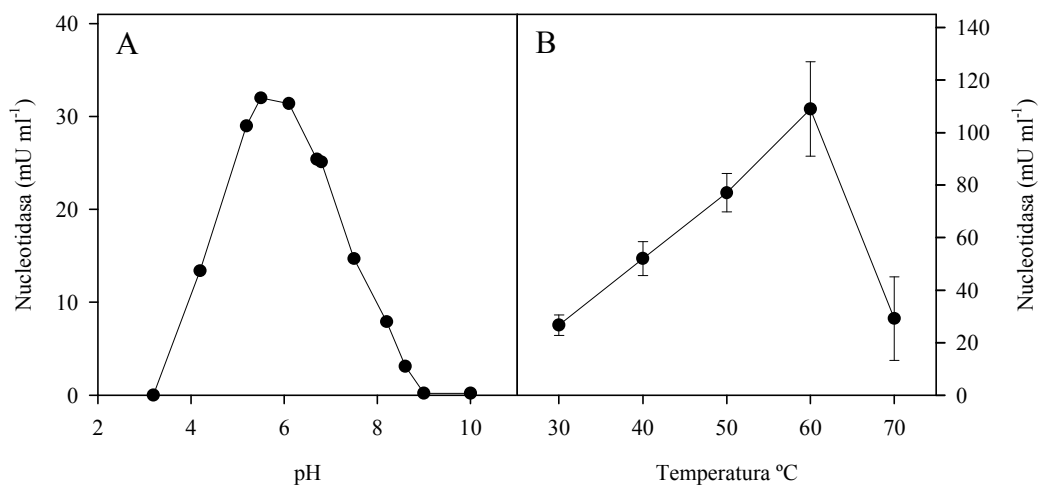
Las actividades fosfatasa ácidas se determinaron entonces en extractos crudos obtenidos a partir de ejes a lo largo de la germinación y desarrollo post-germinativo temprano utilizando IMP como sustrato tanto en presencia como ausencia de molibdato en la mezcla de reacción (Figura 37). La actividad fosfatasa de 55 kDa se detectó tras la germinación (3 DDI) y fue mayor en los ejes de 6 DDI (Figura 37), mientras que la actividad de 110 kDa se detectó únicamente en los extractos 6 DDI y se inhibió totalmente en presencia de molibdato.



**Figura 37.** Actividad nucleotidasa (55 kDa) y fosfatasa ácida (110 kDa) en extractos de ejes de diferente desarrollo. Las diferentes actividades fosfatasas se determinaron en gel de acrilamida (SDS-PAGE) utilizando IMP como sustrato, en ausencia (-Mo) o presencia (+Mo) de molibdato sódico y extractos de ejes de 1, 3 y 6 DDI.

La actividad fosfatasa resistente a molibdato (55 kDa) también se determinó mediante método colorimétrico en los extractos crudos con IMP como sustrato y añadiendo molibdato a la mezcla de reacción. La presencia de DOC en el tampón de extracción no afectó a los valores de actividad en los

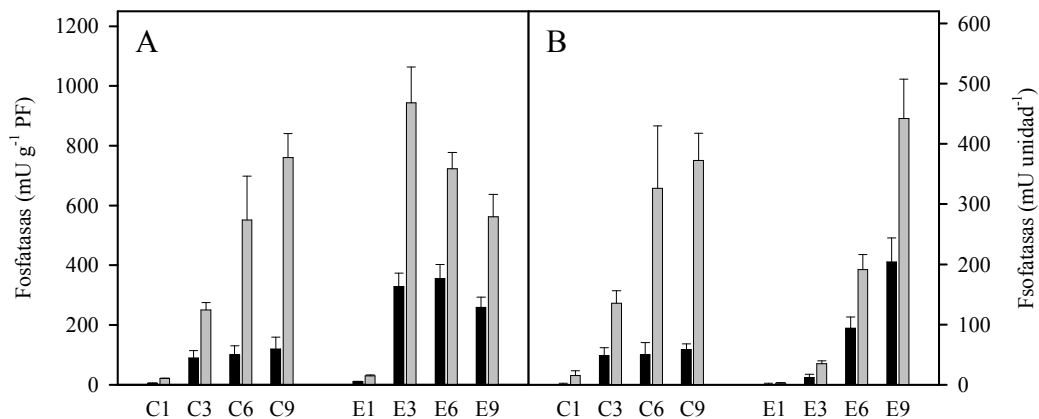
extractos crudos y tampoco la congelación de los extractos crudos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo inferior a una semana. Esta actividad mostró dependencia de la cantidad de extracto crudo añadido y linealidad de al menos durante 60 minutos cuando el ensayo se realizó a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La actividad mostró un pH óptimo para IMP como sustrato de 5,5 (Figura 38-A) y una temperatura óptima de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  cuando el ensayo de actividad se realizó durante 15 minutos (Figura 38-B). La  $K_m$  aparente calculada para extractos crudos con IMP como sustrato fue de  $1,54\text{ mM}$ .



**Figura 38. Determinación de pH y temperatura óptimos para la actividad fosfatasa resistente a molibdato.** Se han utilizado extractos crudos obtenidos a partir de ejes de judía de 6 días de desarrollo. **(A) pH óptimo.** La actividad fosfatasa se midió mediante método colorimétrico con IMP como sustrato, en presencia de molibdato y a distintos pH en los siguientes tampones: succinato (3,2 - 5,2), MES-NaOH (5,5 - 6,7), TES-NaOH (6,8 - 8,2) y CHES (8,6 - 10). **(B) Temperatura óptima.** La actividad fosfatasa se determinó con IMP como sustrato en presencia de molibdato a las temperaturas indicadas utilizando tampón MES pH 5,5. El ensayo de actividad se realizó durante 15 minutos.

Las actividades fosfatasas se determinaron en los extractos de cotiledones y ejes durante el desarrollo mediante el ensayo colorimétrico frente a IMP como sustrato (Figura 39). En cotiledones, la actividad total incrementó con el desarrollo tanto en referencia al peso fresco como a la unidad funcional;

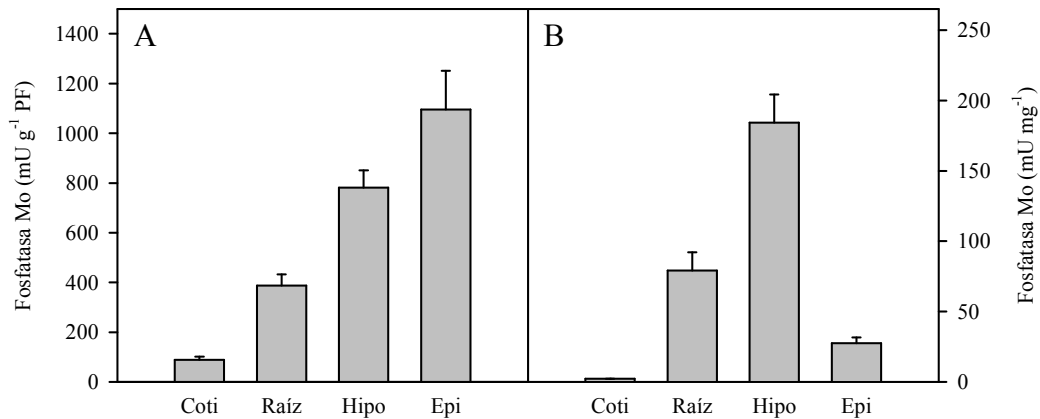
la actividad resistente a molibdato incrementó muy significativamente al inicio de la germinación y luego más ligeramente (Figura 39). En ejes, la actividad total referida a peso fresco incrementó entre los días 1 y 3 (DDI) y decreció a partir de ese momento; un patrón bastante parecido siguió la actividad resistente a molibdato en la fase inicial, y luego se mantuvo prácticamente constante. Cuando se refirió a la unidad funcional, tanto la actividad total como la resistente a molibdato de los ejes incrementaron con el desarrollo, siendo la total prácticamente el doble de la resistente a molibdato (Figura 39). En este periodo hay un gran desarrollo del eje embrionario y por ello las actividades fosfatasa incrementan tan significativamente al expresarlas frente a unidad de tejido.



**Figura 39. Actividad fosfatasa en plántulas de judía.** La actividad fosfatasa tanto resistente a molibdato (barras negras) como total (barras grises) se determinó mediante sistema colorimétrico en extractos obtenidos a partir de cotiledones (C) y ejes (E) de plántulas de 1, 3, 6 y 9 DDI. Se utilizó IMP como sustrato. Los datos se expresaron en mU por gramo de peso fresco (A) y mU por unidad de tejido (B).

En las distintas partes de plántulas de judía de 6 DDI, la actividad fue muy baja en cotiledones en comparación con raíz, hipocótilo y epicótilo (Figura 40). Referida a peso fresco, la mayor actividad se encontró en epicótilo que en este estadio representa únicamente el 14% del peso total del eje. La actividad fue

superior en hipocótilo y raíz cuando los valores se refirieron a cantidad de proteína soluble (Figura 40-B).

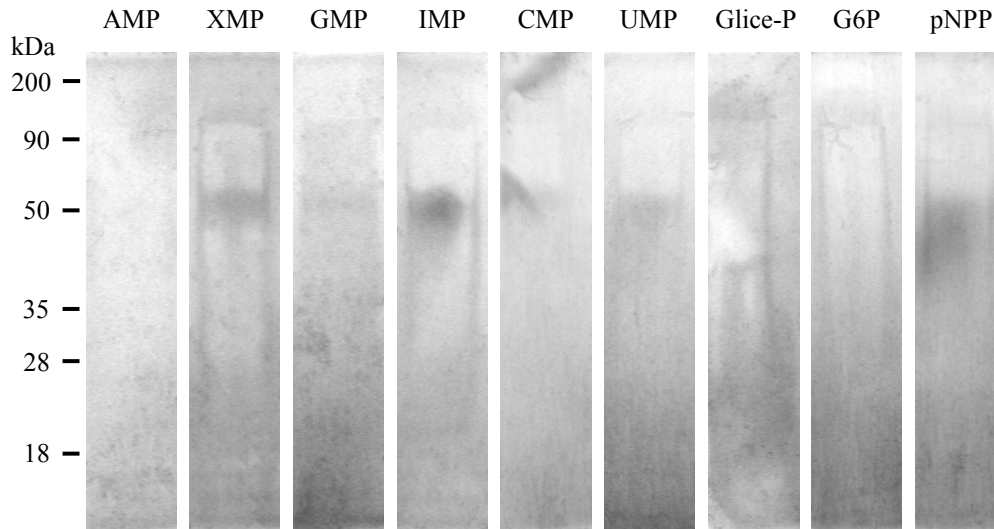


**Figura 40.** *Actividad fosfatasa resistente a molibdato en las diferentes partes de la plántula.* La actividad fosfatasa resistente a molibdato se determinó en extractos crudos obtenidos a partir de cotiledones (Coti), raíz (Raíz), hipocótilo (Hipo) y epicótilo (Epi) de plántulas de judía a los 6 días de desarrollo. La actividad se determinó con IMP como sustrato. Los datos se refieren a g de PF (A) y mg de proteína soluble (B).

### 3.2.- Actividad fosfatasa resistente a molibdato con distintos sustratos.

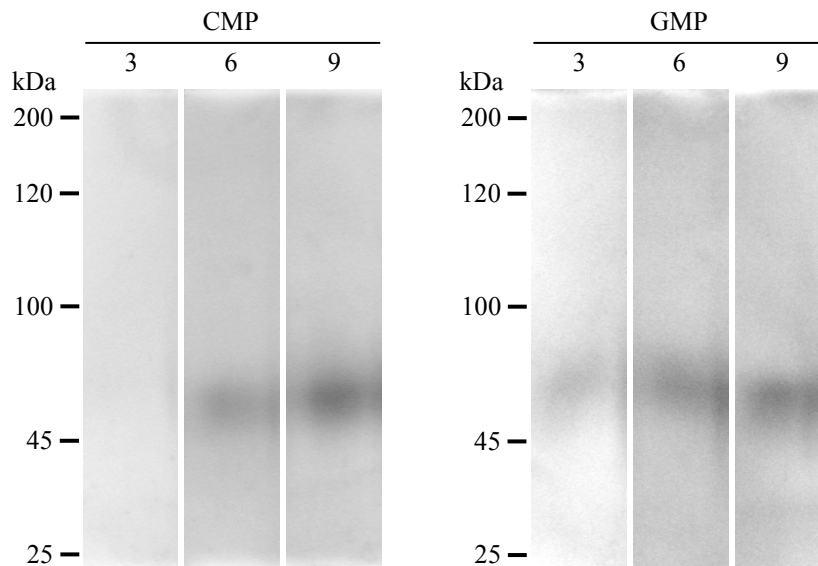
La actividad fosfatasa resistente a molibdato se ensayó en gel utilizando varios compuestos fosforilados como sustratos. Con todos los nucleótidos ensayados excepto con AMP se obtuvo una única banda de actividad fosfatasa resistente a molibdato y con masa molecular de 55 kDa (Figura 41). La actividad fue mayor con los mononucleótidos XMP e IMP, y el sustrato artificial 4-NPP. No se detectó actividad con otros compuestos fosforilados como Glicerol-P o G6-P en las condiciones de ensayo (Figura 41).



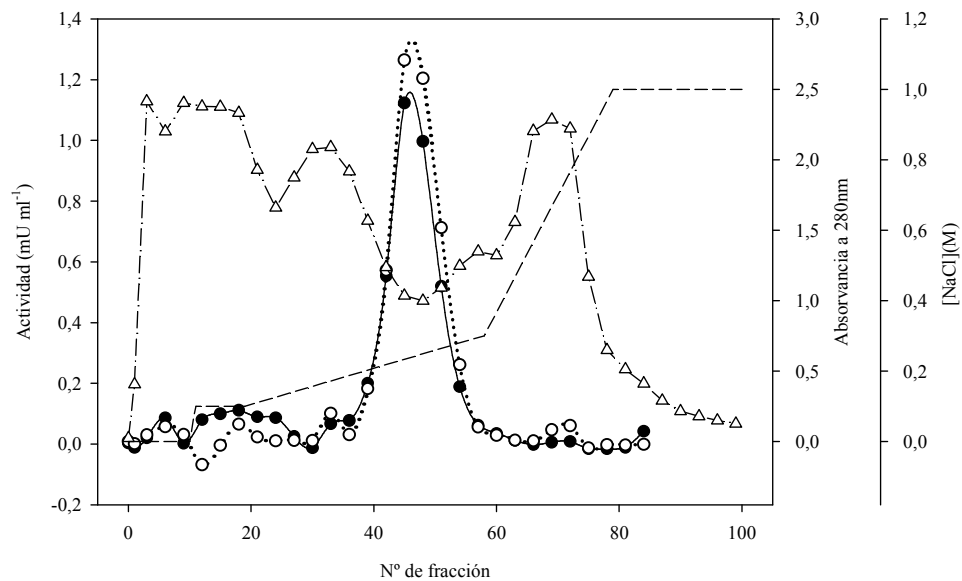


**Figura 41. Actividad fosfatasa resistente a molibdato en gel con varios sustratos.** Extractos de ejes de 7 DDI se resolvieron en SDS-PAGE 10% en condiciones no reductoras y tras la electroforesis se cortaron las calles de gel y se ensayó la actividad con los sustratos indicados a una concentración final de 5 mM. (AMP) adenosina monofosfato, (XMP) xantosina monofosfato, (GMP) guanosina monofosfato, (IMP) inosina monofosfato, (CMP) citidina monofosfato, (UMP) uridina monofosfato, (Glice-P) glicerol monofosfato, (G6P) glucosa 6 fosfato y (pNPP) 4-nitro-fenil-fosfato.

Con el objetivo de determinar posibles diferencias en la actividad fosfatasa resistente a molibdato con nucleótidos de purinas o pirimidinas como sustratos a lo largo del desarrollo de ejes se determinó la actividad en gel con GMP y CMP (Figura 42). La cinética de inducción de la actividad fue similar para ambos sustratos y no se observó ninguna otra proteína con esta actividad (Figura 42). Además, el extracto crudo se sometió a cromatografía de intercambio iónico en DEAE y la actividad resistente a molibdato se midió en las fracciones resultantes con GMP o CMP como sustratos (Figura 43). Con ambos nucleótidos se obtuvo un único pico de actividad a lo largo del cromatograma y que coincidió para ambos (Figura 43).



**Figura 42. Actividad fosfatasa resistente a molibdato con CMP y GMP como sustratos en ejes en desarrollo.** La actividad fosfatasa resistente a molibdato se determinó en gel con CMP o GMP como sustratos en extractos crudos obtenidos a partir de ejes en desarrollo de judía de 3, 6 y 9 días.

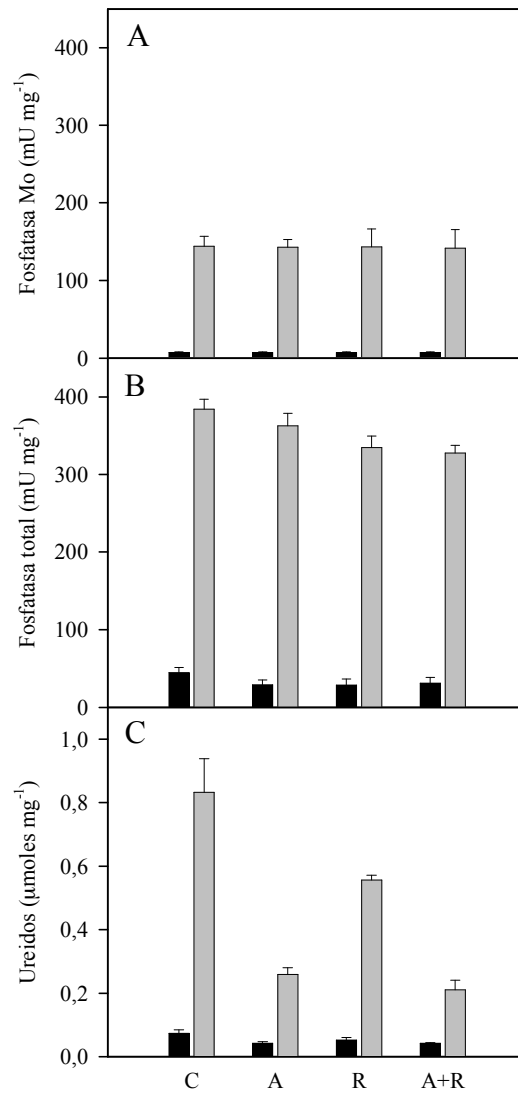


**Figura 43. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel.** El extracto crudo obtenido a partir de ejes de 6 días se cargó en columna (5 x 2,5 cm) de DEAE-Sephacel y se sometió a un gradiente de NaCl (--). La concentración total de proteína (absorbancia a 280nm ( $\Delta$ )) y la actividad fosfatasa resistente a molibdato frente a GMP ( $\circ$ ) y CMP ( $\bullet$ ) se midieron en las fracciones resultantes.

### **3.3.- Actividades fosfatasas en plántulas desarrolladas en presencia de alopurinol y ribavirina.**

La actividad fosfatasa resistente a molibdato y la total se determinaron en extractos de plántulas de judía de 6 DDI germinadas en presencia de alopurinol 3 mM (inhibidor de la xantina deshidrogenasa), ribavirina 0,4 mM (inhibidor de la IMP deshidrogenasa) y de ambos (Figura 44). Los valores de la actividad resistente a molibdato no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Figura 44-A). En contraposición, la actividad fosfatasa total, en ausencia de molibdato, descendió en un 10% en plántulas germinadas en presencia de ribavirina (Figura 44-B).

En los mismos extractos se determinó la concentración de ureidos, y se observó descenso tanto con alopurinol como con ribavirina aunque sin efecto cooperativo entre ambos (Figura 44-C).



**Figura 44. Actividades fosfatasas ácidas y ureidos en plántulas germinadas en presencia de alopurinol y ribavirina.** Plántulas de judía de 6 DDI germinadas en presencia de alopurinol 3 mM (A), ribavirina 0,4 mM (R) o la suma de ambos compuestos (A+R), se separaron en cotiledones (barras negras) y ejes (barras grises), y se determinaron la actividad fosfatasa resistente a molibdato, la actividad fosfatasa total y los ureidos presentes en los extractos obtenidos. En la determinación de las actividades se utilizó IMP como sustrato.



**4.- EXPRESIÓN DE UNA NUCLEOTIDASA DE JUDÍA EN *E. coli*.  
OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS Y DETECCIÓN EN TEJIDOS DE  
JUDÍA**



#### **4.1.- Clonación de una secuencia que codifica una actividad nucleotidasa.**

Con objeto de clonar el ADNc que codifica la enzima responsable de la actividad 5' nucleotidasa en judía, se buscaron secuencias en las bases de datos que codifiquen nucleotidasas citosólicas. En plantas, se identificaron las secuencias AK100007 de *Oryza sativa*, AY107829 de *Zea mays* y la EST TC98544 de *Medicago truncatula*, presentando un alto grado de similitud con secuencias de nucleotidasas de vertebrados y bacterias, cuya funcionalidad se había demostrado. A partir del alineamiento de dichas secuencias con el paquete informático DNASTAR se diseñaron los oligonucleótidos NTD1 y NTD2 (Figura 45). Con ellos se amplificó, mediante PCR y utilizando ADNc de frutos de judía, un fragmento de 213 pb cuya secuencia presentó semejanza con las posibles nucleotidasas (Figura 46, secuencia en azul). Estos mismos oligonucleótidos (NTD1 y NTD2) se utilizaron para la amplificación de los fragmentos 5' y 3' del ADNc mediante la técnica de 5'- y 3'-RACE-PCR. Las secuencias obtenidas para estos fragmentos fueron solapantes entre sí y con el fragmento de 213 pb secuenciado previamente. El ADNc completo se amplificó mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos pertenecientes a ambos extremos del ADNc (NUP-NTD8, NUP-NTD10, NTD3-NTD8, NTD3-NTD10), y su secuencia correspondió con la obtenida previamente para los fragmentos independientes (Figura 46).

El ADNc completo *PvP5N* presentó una longitud de 1286 pb. Mediante la aplicación informática HCpolya (ver Materiales y Métodos) para la identificación de posibles señales de poliadenilación se encontraron dos secuencias para ARNs eucarióticos situadas entre los nucleótidos 1138 y 1147, y 1169 y 1175 (Figura 46). El mayor marco abierto de lectura correspondió a un tamaño de 999 pb y codificaría un péptido de 333 aminoácidos con una masa molecular de 37802 Da, un punto isoeléctrico de 5,8 y una carga neta de -10,3 a pH 7,0. El análisis de la secuencia aminoacídica con el programa TargetP Server v1.1 (ver Materiales y Métodos) sugiere una localización citoplasmática para la



proteína. Distintas características estructurales así como perfiles de hidrofobicidad y propiedades antigénicas se muestran en la Figura 47.

El análisis con el programa Conserved Domain Database and Search Service (v2.16) de la secuencia aminoacídica predicha para el ADNc de *PvP5N* indica que tiene dominios similares a los presentes en miembros de la superfamilia “Haloacid dehalogenase-like hydrolases” (HAD, cl00375) ( $E = 7 \times$

```

AK100007 -----GATCTTCGAAATGCGGCCATGACGAGCCACCTCTCCTCTCGCCCTCCTCC 52
AY107829 -----GCACGAGCTC 10
TC98544 -----TGTAATTCATGCAGAGGCTGATGAGACATATGAATCACATTTCTTAATTAGTTT 55

AK100007 TCCCTCCTCCCGTCTCTCCTCCTCGCCCTCTCTCTCCCGCGCGG----AGCCCGCCTC---GCG 115
AY107829 TTCCTCCTCCG----CTCCTCCCTCTCGCGCGCCCTCGCGCGCGG----AACCTACCACGGGCGG 72
TC98544 TGTTATTTGTTTCCCATTTTCGGTAACACAAATGAGTTATCGCTCCACTCAATCATCTCA 125

AK100007 TCCCTCTCTCCCCCTCGCGCGCCCTCTCTCCCGCTCTCCCTCCCTCTCCCTCCCG 185
AY107829 GCACCTACTTCTCTCCCGCGACCGCCCTCCCGCTCCCTCTCCCGCTCCCTCTCCCTCCCG 142
TC98544 CACCAACTCTCTCTCCCGCTCACTTTTCACAATCAAGGGTTCTATTTCTTACATTTTGTTGTGGAAAAT 194

AK100007 CCGCCACCAGAAACCCCGCTCCGTCCTCGCGACCGCGCCCTCGCCCGCAAGGTGGCCGCCATCCG 255
AY107829 CCGCC-----CCCCACTCCGTCGTGGCGACCCACTACTCTGGCCCGCAAATGGCAGACATCCG 203
TC98544 ATTTGGAAATGAGGATATCAAATGGTGGGTGATCTGTTTGTCTCCACAACAACTGGCTCAATTCG 264

AK100007 CGCCGCGGCCCGCTAACTCAGGTCATCCGCGACTTCGAGCGCACCTCACGCGGTACTGGTTACGC 325
AY107829 TCCGCCCGACCCCAAACTCAGGTTATCGCGCGACTTCGATGGCACCTCACGCGGTACTGGTTACGC 273
TC98544 TCCGCCCGCTCCAAAACTCAGGTCATCCGCGACTTCGATGGCACCTCACGCGGTACTGGTTACGC 334

```

**NTD1**

```

AK100007 GGCTCCCGGGCASAGAGCCATGGGTGGCTGAGCAGGGAACGAGAGTACGACGCCAASAGGGAG 395
AY107829 GGCGCCCGGGCASAGAGCCATGGGTGGCTGAGCAGGGAACGAGAGTACGACGCCAASAGGGAG 343
TC98544 GGAACTCGAGGGCASAGAGCCATGGGTGGCTGAGCAGGGAACGAGAGTACGACGCCAASAGGGAG 404

AK100007 ACTCTTCGACACTACCACCCACTCGAGATCTGCCCCACTCCCGCTCCCGGAAGSCCAAGCTCAT 465
AY107829 CGTTCTATCACACTACCACCCACTCGAGATCTGCCCCACTCCCGCTCCCGGAAGSCCAAGCTCAT 413
TC98544 AGTTATATGACACTACCACCCACTCGAGATCTGCCCCACTCCCGCTCCCGGAAGSCCAAGCTCAT 474

AK100007 GGAAGAATGGTGGGGAAASACACATGCTCTCTTATCGAAGGTGGCTTACATATGAAGCTATAAGGCCA 535
AY107829 GGAAGAATGGTGGGGAAASACTCATGCTCTCTTATCGAAGGTGGCTTACATATGAAGCTATAAGGCCA 483
TC98544 GGAAGAATGGTGGGGAAASACTCATGCTCTCTTATCGAAGGTGGCTTACATATGAAGCTATAAGGCCA 544

```

**NTD2**

```

AK100007 TCTGTGGCTGATGCTAAATCACTTTTAGAGATGGAGTGGTGAAGCTCTTTGAGTCTTTGGAGGAGAGA 604
AY107829 TCTGTCTCTGATGCCGCAATCTTTTAGAGAGGGTGGTGGAGCTCTTTGAGTCTTTGGAGGAGAGA 552
TC98544 TCAGTGCTTAATGCTAACATAGCTTTTAGGGAAGGTGGTGGAGCTTTTTGAATTTTGGAGGAAAGA 614

AK100007 GATATTCCACTATAGTATTTCTGTCGACTTCGACACATATATTGAGGAGGTCTCCGGCAAAACTCC 674
AY107829 GATATTCCACTATAGTATTTCTGTCGACTTCGACACATATATTGAGGAGGTCTCCGGCAAAACTCC 622
TC98544 ACATTCCACTATAGTATTTCTGTCGACTTCGACACATATATTGAGGAGGTCTCCGGCAAAACTCC 684

AK100007 ACAGATCATTCAGA 689
AY107829 ACAAACATTCAGA 637
TC98544 GCAGATCATTCAGA 695

```

**Figura 45. Diseño de los oligonucleótidos NTD1 y NTD2.** Las secuencias AK100007 de *Oryza sativa*, AY107829 de *Zea mays* y TC98544 de *Medicago truncatula* se alinearon y los nucleótidos conservados en las tres se marcan en negro. Los rectángulos engloban las áreas utilizadas para el diseño del oligonucleótido y en rojo la secuencia correspondiente a los oligonucleótidos elegidos.

$10^{-7}$ ) y multidominios para la familia 5'-Nucleotidasa de pirimidinas (UMPH-1, pfam05822) ( $E = 3 \times 10^{-51}$ ).

```

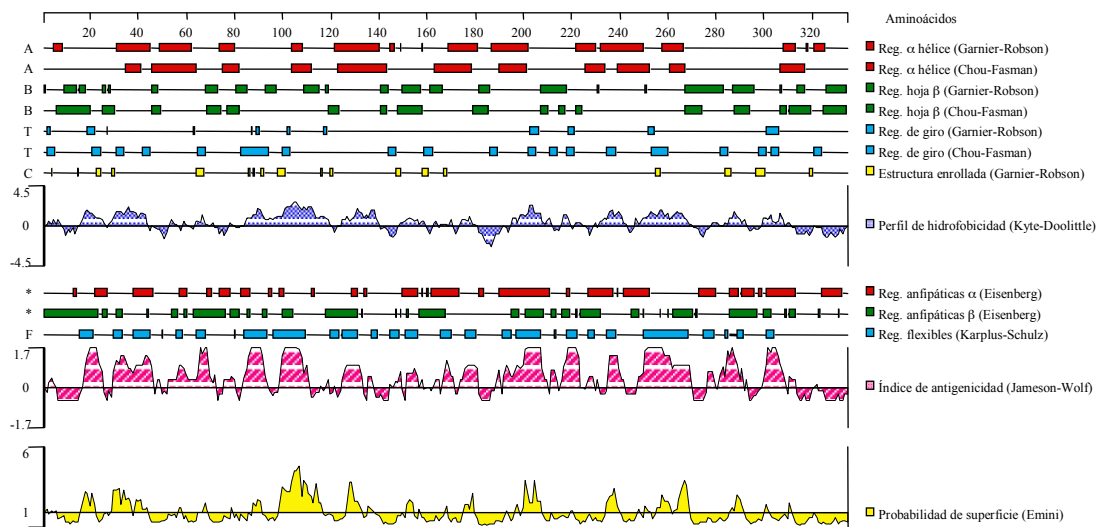
acgcggggacactataaatgaattatagcttccaatttcaagttcaagcc 33
                                M N Y S F Q F Q V Q A
atcgccacacctcctttcgccaacgccacttctcctcttttctccgttacacagcctcaaggagaaat 102
I V H T S F R Q R H F S S F L R Y T A S R R N
ttagaaatgaaggaagtgaaggatgcttcggacttgggtgggtgaccctgctttgatggagacgaaa 171
L E M K E V K D A S D L L V G D P A L M E T K
attgaagcaattcgtttgggtgggtcccagaagcttcagggtgattgctgattttgatgccacgttaact 240
I E A I R L G G P Q K L Q V I A D F D A T L T
aagtttccggtaaatggaaccgctggccaatccagtcagcttggccttttgcagcagggtaatccggaatat 309
K F S V N G T R G Q S S H G L L Q Q G N P E Y
gatgcaagaggcagcagttatgaatattaccatccattagaattttcaccgactattggacttgaa 378
D A K R Q Q L Y E Y Y H P L E F S P T I G L E
gagaaaaacgaagctcatggaagagtggtgggaaaaaacacatgctcctgcttggaggaggagaaat 447
E K T K L M E E W W G K T H A L L V E G G L T
tatgaatcaataaggcaatctggttgcataatgccaacatagctttcaggaaggtgttctcgaacttttt 516
Y E S I R Q S V A N A N I A F R E G V P E L F
gagtttctggaggaagagacattcctgtgtaataattctctgcaggctcgtgataccattgaagag 585
E F L E E R D I P V L I F S A G L A D T I E E
gtcctaaggcagaaacttcacagatccttcaagaatgtgaggatagtagtccaacagaatggtatttgat 654
V L R Q K L H R S F K N V R I V S N R M V F D
gacaatggcagccttgcattttaaaggaaaattgattcatagcttaataaaaaatgagcattgctct 723
D N G S L V S F K G K L I H S L N K N E H A L
gatatggcagctcctgttcagagaggtttggtgatattggatggctcactgatgacaatgcctcattg 792
D M A A P V H E R F G D M D G P T D D N A S L
aagaagagaaccaatgttctccttctcggatcatcttgagacttgggaatgtctgatggtttgaaat 861
K K R T N V L L L G D H L G D L G M S D G L N
tatgagactcgaatatccttgggattcctgaaccacaacattgagaactcactcagctgctatcgagaa 930
Y E T R I S L G F L N H N I E N S L S C Y R E
gcttttgatggtttttgtgaatgatgcacctatgtggggagtaatacaattggtctcctcaatgtgt 999
A F D V V F V N D A P M W G V I K L V S Q M C
tgaagtgtggtgcatgattatttctagttatggtatattcttagcagtcctcattctttttgttgat 1068
*
atatcttaggattcctcattatcaaatcatattatctatagttttaagaaaactgttcacaatctcaa 1137
ccattaaaatgttttgttctcgtgaataatgttataaatattgtcaaaagaatggcatcaatcagatgt 1206
gtaactgctggaactacagctgttttttttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1270

```

**Figura 46. Secuencia nucleotídica correspondiente al ADNc de pv5n y la secuencia aminoacídica deducida.** La secuencia nucleotídica se numera desde el primer codón de iniciación. Se representa el codón de inicio de traducción para el ORF de mayor tamaño y las dos posibles señales de poliadenilación marcadas de amarillo. En azul se representa la secuencia obtenida tras amplificar con los oligonucleótidos NTD1 y NTD2.

En la Figura 48 se muestra el alineamiento de la secuencia aminoacídica de PvP5N de judía con otras nucleotidasas de pirimidinas disponibles actualmente en la base de datos GENBANK y localizadas mediante la técnica BLAST. La secuencia PvP5N presenta un gran número de aminoácidos conservados y que coinciden con los dominios descritos para UMPH

(5' nucleotidasa de pirimidinas tipo 1). Los aminoácidos marcados con triángulos rojos corresponden a los aminoácidos que delimitan el sitio activo de la nucleotidasa de ratón (Bitto et al. 2006). En la secuencia se localizaron los motivos M(I) (DxDx[T/V][L/V/I]), M(II) (§ § § [T/S], siendo § aminoácidos hidrofóbicos), M(III) (K[§ § §]), siendo § aminoácidos implicados en una alfa-helice) y M(IV) (DD o GDx(3-4)D), característicos de la superfamilia HAD (Burroughs et al. 2006), y el Motivo S (Px(7-8)[R/K]xGF[W/L]) (Rinaldo-Matthis et al. 2002) (Figura 48, rectángulos rojos).



**Figura 47. Características estructurales, perfil de hidrofobicidad y propiedades antigénicas de la proteína PvP5N.**

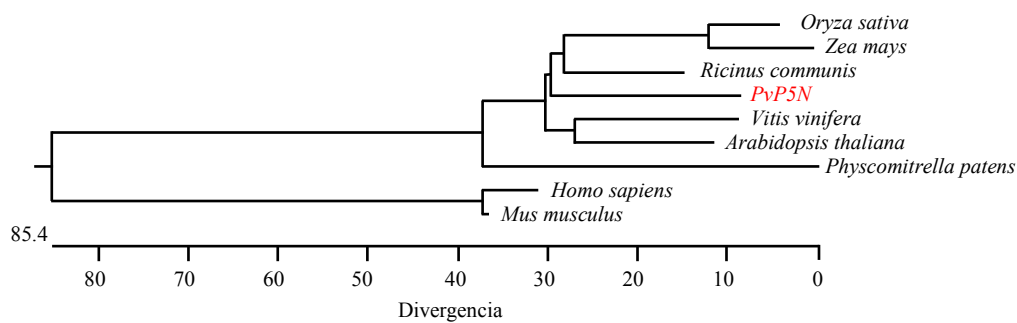
**Figura 48 (página de la derecha). Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por PvP5N con varias nucleotidasas de pirimidinas. El alineamiento se realizó por el método Clustal V del programa BioEdit. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias se colocaron en fondo negro y en fondo gris para los aminoácidos conservados en al menos 5 secuencias. Los rectángulos rojos engloban los motivos característicos M(I), M(II), M(III) y M(IV) de la superfamilia HAD (Burroughs et al. 2006), y el motivo M(S) descrito por (Rinaldo-Matthis et al. 2002). Los triángulos rojos identifican a los residuos relacionados con el centro activo de P5N de ratón (Bitto et al. 2006). El alineamiento incluye las secuencias de PvP5N (proteína deducida del ADNc clonado de *Phaseolus vulgaris*), *Vitis vinifera* (GSVIVG01034599001), *Ricinus communis* (XP\_002514465), *Oryza sativa* (Os03g44660), *Zea mays* (GRMZM2G157310), *Arabidopsis thaliana* (AT2G38680), *Physcomitrella patens* (Pp1s59\_93V6), *Homo sapiens* (NP\_001002010) y *Mus musculus* (NP\_080280).**

PvP5N	MNY-----SFQFQV---QAIVHTS-----FRQRHFSSFLRYT-----	29
Vitis	MSYL-----PRSSSGSS--VISSII-----IKPVRFPFVWCCT-----	32
Ricinus	MDM-----SKV---TVIDDVL-----S-----	14
Oryza	MRPMT---SPLL-----SPSSSSRRL--LLRLLL-----SRRRSPAS-----	34
Zea	MRPMT---NPPLL-----SPSFPF---LLRLLLH-----LSRAPRRRRNPTTG-----	36
Arabidopsis	ME-----	2
Physcomitrella	MSGVAVGAWSQALVRCATFCTPHTSTPVSVGHALLQHFLRGWPGNEVKRNVRSVGFSTGTACAAGVCKKT	70
Homo	MRAPSM---DRAAVARVGAVASASVCAVAGVVLAQYIF-----TLKRKTGR-----	44
Mus	----M---DRAAVARVGAVASASVCAVAGVVLAQYIF-----TLKRKTGR-----	39
PvP5N	-----ASR-----RNLEMKEVKDASDL-----LVGDPALMETK	57
Vitis	-----HTPINQTO-----TAMEQLDPSKSSQV-----VVPHPHLLHAK	65
Ricinus	-----RSPPPPLR-----RRLPLLAASMSSSSSTAATRNL-----PGSVVADADGLARK	77
Oryza	-----RAPTCTSR-----DRLPLL---LPAAMSSASNTA-----PHSVVADPTTLARK	76
Zea	-----PCELSANT-----VIAHPRALTDK	21
Arabidopsis	FFCFPHSNSSSLRLYHRTSRLPYQQLALNGLAGSCKSVSSMEKQHVNTRLTAPDCPPDVVIGNPQLEEK	140
Physcomitrella	-----KTKIIEMMPEFQKSSVR-----IKNPTRVEEI	71
Homo	-----KTKIIEMMPEFQKSSVR-----IKNPTRVEEI	66
Mus	-----KTKIIEMMPEFQKSSVR-----IKNPTRVEEI	66
PvP5N	TEAIRLGGPQKLOVIADFDATLTKFSVNGTRG-QSSHGLLQOGNPEYDAKRQOOLY---EYVHPLEFSPTI	123
Vitis	ISSIRMAHSHKLOVIADFDATLTKYVWNGCRG-QSSHGLLQOGNPEYDVKRRELY---DYVHPLEFSPTI	131
Ricinus	IDAIRTAGTSKLOVIADFDATLTKYVWNGCRG-QSSHGLLQOGNPEYDAKRQOALF---EYVHPLEFSPTI	84
Oryza	VAAIRAAQPAKLOVIADFDATLTRYWYDGRG-QSSHGLLQOGNPEYDAKREELF---EYVHPLEFSPTI	143
Zea	IADIRAAQPTKLOVIADFDATLTRYWYDGRG-QSSHGLLQOGNPEYDAKREELF---EYVHPLEFSPTI	142
Arabidopsis	MTLIRDAGPSKFOVIADFDATLTRYVNGRGRQTSGLLQOGDAYDAKRQOALY---DHYVHPLEFSPTI	88
Physcomitrella	KKALKSAGLSLTOVIADFDATLTKYLVGVRG-QSTHALLK-SNPAYDRKRHELF---EYVHPLEFSPTI	205
Homo	ICGLIKGAAKLOVIADFDATLTRYWYDGRG-QSSHGLLQOGNPEYDAKREELF---EYVHPLEFSPTI	140
Mus	ICGLIKGAAKLOVIADFDATLTRYWYDGRG-QSSHGLLQOGNPEYDAKREELF---EYVHPLEFSPTI	135
PvP5N	GLEEKTLMEEWWEKTHALLIEGGLTYEAIKTSVANANIAFREGVPELFEELERDIPVLLFSAGLADTI	193
Vitis	PIEEKAKLMEEWWEKTHALLIEGGLTYEAIKTSVANANIAFREGVPELFEELERDIPVLLFSAGLADVI	201
Ricinus	PVEEKAKLMEEWWEKTHALLIEGGLTYEAIKTSVANANIAFREGVPELFEELERDIPVLLFSAGLADII	154
Oryza	PLPEKAKLMEEWWEKTHALLIEGGLTYEAIKTSVANANIAFREGVPELFEELERDIPVLLFSAGLADII	213
Zea	PLSEKAKLMEEWWEKTHALLIEGGLTYEAIKTSVANANIAFREGVPELFEELERDIPVLLFSAGLADII	212
Arabidopsis	PIDEKTKLMEEWWEKTHALLIEGGLTYEAIKTSVANANIAFREGVPELFEELERDIPVLLFSAGLADVI	158
Physcomitrella	PADEKAKHMEEWWEKTHALLIEGGLTYEAIKTSVANANIAFREGVPELFEELERDIPVLLFSAGLADII	275
Homo	TVEEKPYMVEWYTKSHGLLIEQGLIPKAKLKEIVADSDVMLKEGYENFFGKLQOHGIPVLLFSAGIGDVL	210
Mus	TVEEKPYMVEWYTKSHGLLIEQGLIPKAKLKEIVADSDVMLKEGYENFFGKLQOHGIPVLLFSAGIGDVL	205
PvP5N	BEVLRQKLHRSFKNVRIVSNRMVFDNCGSLVSFKCKLIHVLNKNNEHALDMAAPVHERFG-DMDGPTDDNA	262
Vitis	BEVLRQKLHRSFKNVRIVSNRMVFDNCGSLVSFKCKLIHVLNKNNEHALDMAAPVHERFG-DMDGPTDDNA	270
Ricinus	BEVLRQKLHRSFKNVRIVSNRMVFDNCGSLVSFKCKLIHVLNKNNEHALDMAAPVHERFG-DMDGPTDDNA	223
Oryza	BEVLRQKLHRSFKNVRIVSNRMVFDNCGSLVSFKCKLIHVLNKNNEHALDMAAPVHERFG-DMDGPTDDNA	282
Zea	BEVLRQKLHRSFKNVRIVSNRMVFDNCGSLVSFKCKLIHVLNKNNEHALDMAAPVHERFG-DMDGPTDDNA	281
Arabidopsis	BEVLRQKLHRSFKNVRIVSNRMVFDNCGSLVSFKCKLIHVLNKNNEHALDMAAPVHERFG-DMDGPTDDNA	228
Physcomitrella	BEVLRQKLHRSFKNVRIVSNRMVFDNCGSLVSFKCKLIHVLNKNNEHALDMAAPVHERFG-DMDGPTDDNA	344
Homo	BEVLRQKLHRSFKNVRIVSNRMVFDNCGSLVSFKCKLIHVLNKNNEHALDMAAPVHERFG-DMDGPTDDNA	264
Mus	BEVLRQKLHRSFKNVRIVSNRMVFDNCGSLVSFKCKLIHVLNKNNEHALDMAAPVHERFG-DMDGPTDDNA	259
PvP5N	SLKKRTNVLVLDGHIHGDLCMSDGL-NYETRISIGELNNDNIENSLSCYREAFDVFVNDAPMVGVIKLVSQ	331
Vitis	SVKKRTNVLVLDGHIHGDLCMSDGL-NYETRISIGELNNDNIENSLSCYREAFDVFVNDAPMVGVIKLVSQ	339
Ricinus	LVKKRTNVLVLDGHIHGDLCMSDGL-NYETRISIGELNNDNIENSLSCYREAFDVFVNDAPMVGVIKLVSQ	292
Oryza	LVKKRTNVLVLDGHIHGDLCMSDGL-NYETRISIGELNNDNIENSLSCYREAFDVFVNDAPMVGVIKLVSQ	351
Zea	LVKKRTNVLVLDGHIHGDLCMSDGL-NYETRISIGELNNDNIENSLSCYREAFDVFVNDAPMVGVIKLVSQ	350
Arabidopsis	NMKERRNVLVLDGHIHGDLCMSDGL-NYETRISIGELNNDNIENSLSCYREAFDVFVNDAPMVGVIKLVSQ	297
Physcomitrella	IIQGRSNVLVLDGHIHGDLCMSDGL-NYETRISIGELNNDNIENSLSCYREAFDVFVNDAPMVGVIKLVSQ	413
Homo	QLKDNSNIIILGDSQGLRMADGVANVEHILKIGVLDNDRVDELEKYMDSYDVLVQDESLEEVANSILQ-	333
Mus	QLKDNSNIIILGDSQGLRMADGVANVEHILKIGVLDNDRVDELEKYMDSYDVLVQDESLEEVANSILQ-	328
PvP5N	MC	334
Vitis	LCSTEG-----D	346
Ricinus	LCASAV-----S	299
Oryza	LC-----P	354
Zea	LC-----P	353
Arabidopsis	LFSTEAINLTAVIDVKEP	315
Physcomitrella	L-----RT	416
Homo	-----KIL	336
Mus	-----KTL	331

Figura 48.

La comparación de la secuencia aminoacídica predicha de la P5N de *Phaseolus vulgaris* mostró menor distancia filogenética con la secuencia de *Arabidopsis* (crucífera) que con las de *Oriza* y *Zea* (gramíneas) (Figura 49).

En la Tabla 6 se muestra la identidad en porcentajes, poniéndose de relieve la similitud existente entre la P5N de *Phaseolus* y el resto de plantas: un 66,5% con *Arabidopsis* (crucífera) y un 60,2% con *Physcomitrella* (briofito). La tabla de divergencias expone numéricamente la representación gráfica hecha en la Figura 49.



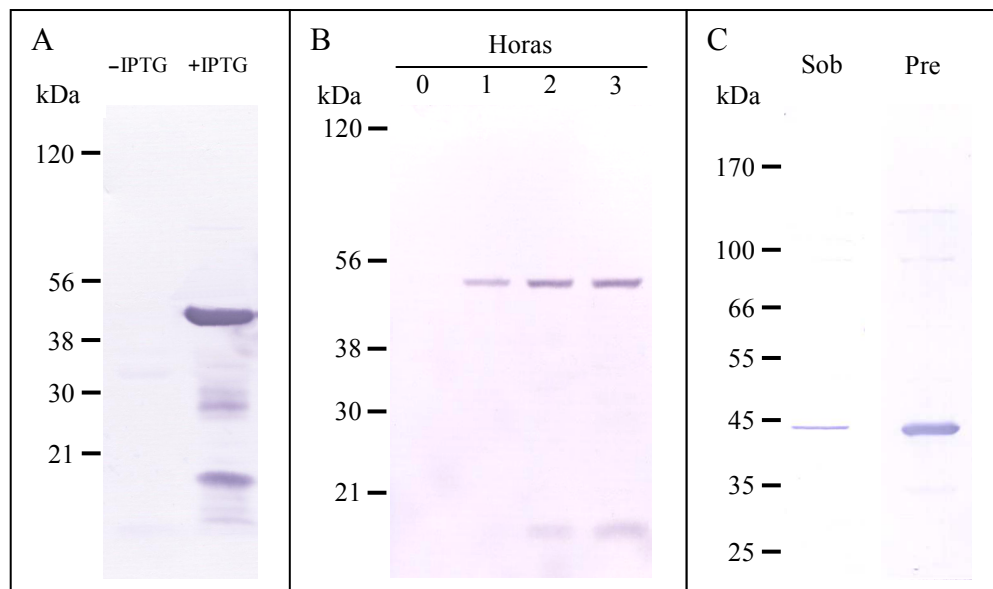
**Figura 49. Distancias filogenéticas entre diferentes nucleotidasas de pirimidinas.** Cladograma construido con el alineamiento múltiple de la Figura D4. El alineamiento incluye las secuencias de PvP5N (proteína deducida del ADNc clonado de *Phaseolus vulgaris*), *Vitis vinifera* (GSVIVG01034599001), *Ricinus communis* (XP\_002514465), *Oryza sativa* (Os03g44660), *Zea mays* (GRMZM2G157310), *Arabidopsis thaliana* (AT2G38680), *Physcomitrella patens* (Pp1s59\_93V6), *Homo sapiens* (NP001002010) y *Mus musculus* (NP\_080280).

**Tabla 6. Grado de identidad y divergencia a nivel proteico entre las nucleotidasas de pirimidinas de distintos organismos, incluida la de *P. vulgaris* en estudio.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<b>PvP5N</b>		66,5	70,9	63,2	60,5	62,5	52,4	29,3	30,5	<b>1</b>
<i>Vitis vinifera</i>	42,4		71,2	63,3	61,0	67,6	52,3	27,4	28,7	<b>2</b>
<i>Ricinus communis</i>	34,3	36,3		69,6	66,6	66,6	56,9	30,1	31,4	<b>3</b>
<i>Oryza sativa</i>	47,6	44,8	36,5		79,3	60,0	51,7	25,3	29,0	<b>4</b>
<i>Zea mays</i>	53,0	51,0	42,0	19,6		59,7	49,6	24,7	28,4	<b>5</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	41,6	33,7	37,6	44,9	43,7		50,5	24,8	25,7	<b>6</b>
<i>Physcomitrella patens</i>	66,8	66,8	57,8	67,8	75,0	63,9		28,3	29,9	<b>7</b>
<i>Homo sapiens</i>	129,5	134,8	126,9	139,2	139,2	119,0	140,4		93,7	<b>8</b>
<i>Mus musculus</i>	124,9	129,5	120,5	131,7	131,6	119,4	133,2	6,6		<b>9</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	

#### 4.2.- Expresión de un ADNc que codifica una nucleotidasa de *Phaseolus vulgaris* en *E. coli*.

La región codificante del ADNc clonado que codifica una posible nucleotidasa de judía se insertó en el plásmido pET-30b+ siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. El plásmido resultante se introdujo en células de *E. coli* BL21. Estas células sobreexpresaron la proteína recombinante tras inducción con IPTG 1 mM (Figura 50-A). La proteína recombinante no se detectó en las células no inducidas ni en células no transformadas. La proteína recombinante tenía una masa molecular de aproximadamente 44 kDa que coincidió con la esperada (43 kDa). La abundancia relativa de las proteínas inferiores observadas



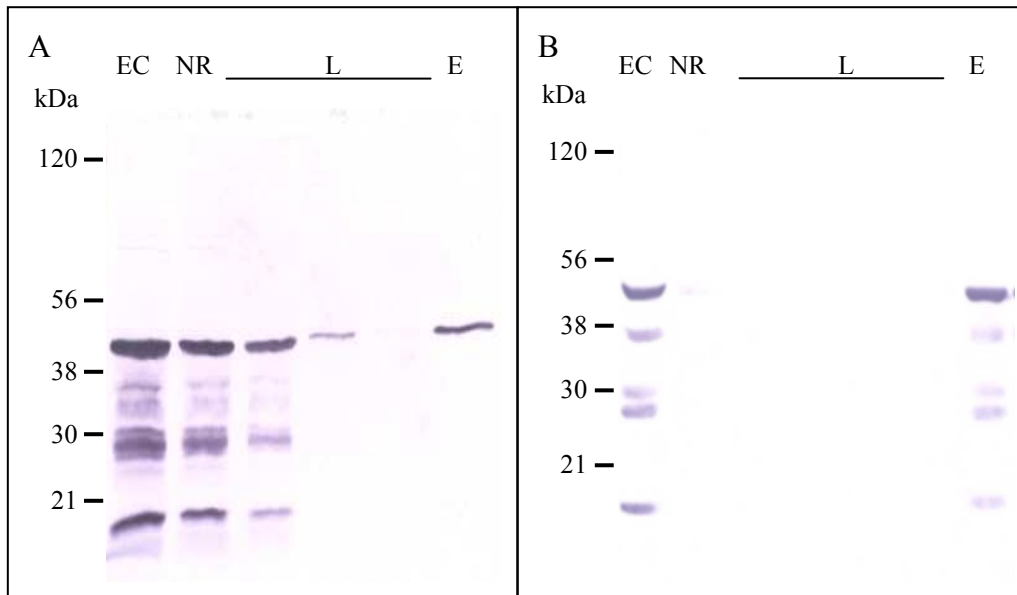
**Figura 50. Sobreexpresión de la proteína recombinante Hys-PvP5N.** (A) El clon que contenía la construcción PvP5N-pET se cultivó hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5 y a continuación se indujo durante 90 minutos a 37 °C sin y con IPTG 1 mM. La suspensión de bacterias se mezcló directamente con tampón de carga y, tras hervir, la expresión se analizó mediante técnica de Western blot utilizando anticuerpos antihistidinas. (B) Bacterias transformadas con la construcción PvP5N-pET se cultivaron a 37 °C hasta alcanzar una  $A_{600}$  de 0,5. Se añadió IPTG hasta alcanzar una concentración de 1 mM y se descendió la temperatura a 30 °C. La expresión de la proteína recombinante se analizó como se ha descrito anteriormente a los tiempos de inducción indicados. (C) Tras inducir con IPTG durante 120 min a 30°C como se ha indicado en B, las células se rompieron mediante sonicación, se centrifugaron a 12.000 g durante 15 min y se separaron la fracción soluble (Sob) del precipitado (Pre) que se resuspendió en el mismo volumen de tampón. La expresión de la proteína recombinante se analizó mediante Western blot como se ha indicado anteriormente.

tras inducir las células con IPTG durante 90 min a 37 °C (Figura 50-A) disminuyó cuando la inducción se realizó a 30 °C durante 120 min de cultivo (Figura 50-B). La proteína recombinante se encontró principalmente en la fracción insoluble, lo que indica la formación de cuerpos de inclusión (Figura 50-C). La inducción con IPTG a una temperatura de 15 °C no aumentó la proporción de proteína soluble frente a proteína insoluble presente en los extractos al compararla con la presente a 30 °C.

#### **4.3.- Purificación de la proteína recombinante.**

La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad, como se describe en Materiales y Métodos, en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes. En condiciones no desnaturizantes, la cantidad de proteína que se retuvo en la columna fue muy baja y, por tanto, el rendimiento de este sistema de purificación fue igualmente muy bajo (Figura 51-A). La purificación en condiciones desnaturizantes se llevó a cabo en presencia de urea y se obtuvo un mayor rendimiento en la recuperación de proteína pura (Figura 51-B).

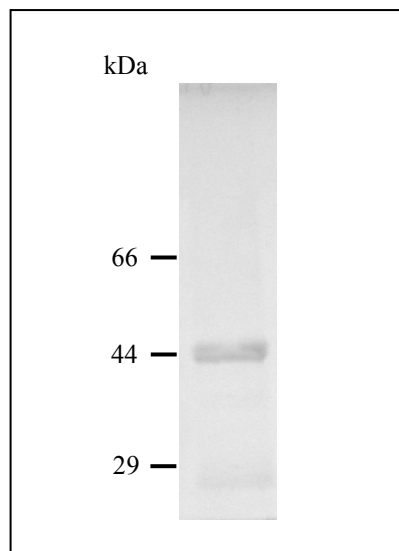
Las fracciones de proteína pura obtenidas se dializaron frente a un tampón salino y el grado de pureza se analizó mediante SDS-PAGE (Figura 52).



**Figura 51. Análisis del proceso de purificación de la proteína recombinante PvP5N.** Bacterias que contenían el plásmido PvP5N-pET se indujeron durante 2 horas a 30 °C con IPTG 1 mM, como se indica en Materiales y Métodos. Las células se recogieron mediante centrifugación.

**(A) Condiciones no desnaturizantes.** Las células se resuspendieron en el tampón de lisis no desnaturizante y se rompieron por sonicación. Tras centrifugar, la fracción soluble (EC) se aplicó a una columna de afinidad Chelating Sepharose Fast Flow (CSFF) cargada con  $\text{Ni}^{2+}$ . Se recogieron las proteínas no retenidas (NR), se eliminaron las proteínas más débilmente unidas con tampón con imidazol 0,025 M (L) y se purificó la proteína Hys-PvP5N con tampón con imidazol 0,3 M (pH 7,4) (E).

**(B) Condiciones desnaturizantes.** El proceso fue igual al descrito en (A) pero a los tampones se le añadió urea hasta alcanzar una concentración final de 8 M.



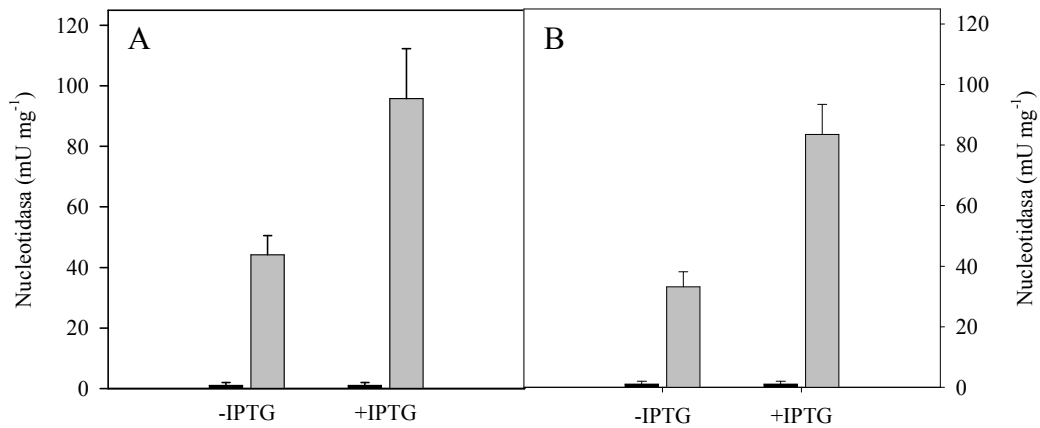
**Figura 52. Análisis mediante SDS-PAGE de la proteína recombinante Hys-PvP5N purificada.** La proteína purificada en condiciones desnaturizantes se dializó frente a tampón salino y se resolvió mediante SDS-PAGE (10%) en condiciones reductoras. El gel se tiñó con Coomassie un paso.



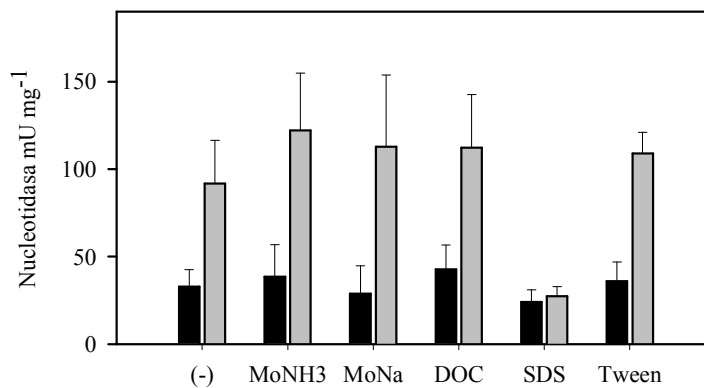
#### 4.4.- Actividad de la proteína recombinante Hys-PvP5N.

La proteína purificada no mostró actividad fosfatasa en las condiciones de ensayo utilizadas: proteína purificada en condiciones desnaturalizantes o no desnaturalizantes, pH ácido o alcalino, ausencia o presencia de  $Mg^{+2}$ , etc. Sin embargo, la proteína recombinante soluble presente en los extractos crudos obtenidos a partir de cultivos bacterianos transformados con el gen de la nucleotidasa sí presentó actividad (Figura 53). La inducción con IPTG de células transformadas con el plásmido PvP5N-pET produjo una mayor actividad fosfatasa, tanto con CMP como con AMP como sustratos (Figura 53). El valor de actividad en la fracción insoluble fue insignificante, lo que indica que la proteína en cuerpos de inclusión no muestra actividad. La actividad fosfatasa del sobrenadante de las células no inducidas se debe a la actividad bacteriana, puesto que fue similar en células no transformadas y transformadas con un gen control e inducidas con IPTG.

El efecto del molibdato y de varios detergentes sobre la actividad nucleotidasa de los extractos de células de *E. coli* que sobreexpresan la proteína a partir del gen de judía se analizó *in vitro* (Figura 54). Para cuantificar la actividad nucleotidasa endógena de *E. coli*, se utilizaron extractos de células transformadas con el plásmido pET que contenía un gen control y se habían inducido con IPTG. La actividad nucleotidasa sobreexpresada mostró actividad en presencia de molibdato y de varios detergentes. Solo el detergente iónico SDS inhibió dicha actividad, presentando un nivel idéntico al obteniendo para la actividad endógena de *E. coli* (Figura 54).



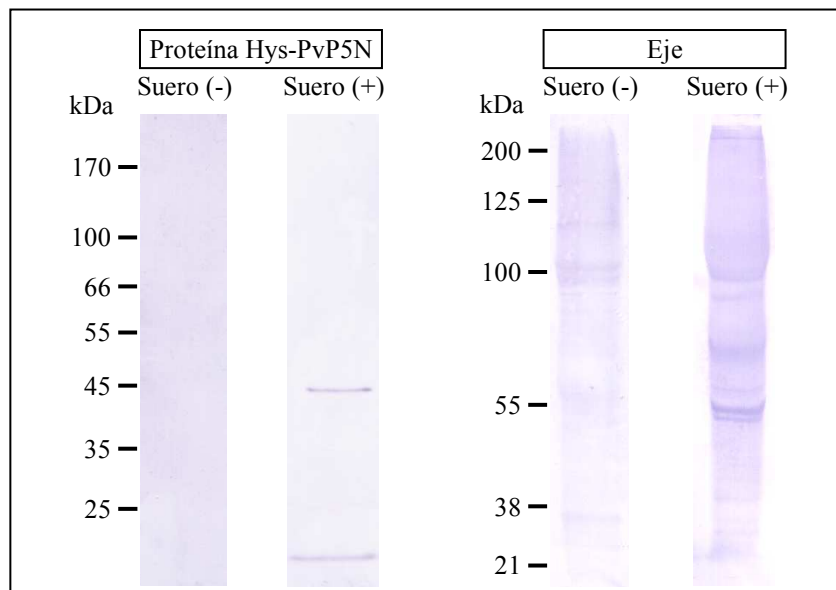
**Figura 53. Actividad nucleotidasa en los extractos crudos de *E. coli*.** Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido PvP5N-pET, no inducidas (-IPTG) o inducidas con IPTG (+IPTG) durante 3 h a 18 °C, se recogieron y lisaron como se ha indicado previamente. Tras centrifugar se separaron el sobrenadante (barras grises) y el precipitado se resuspendió en el mismo volumen de tampón (barras negras), y se determinó la actividad nucleotidasa con CMP (A) o AMP (B) como sustratos.



**Figura 54. Efecto de varios compuestos sobre la actividad nucleotidasa expresada en *E. coli*.** Extractos obtenidos por lisis y centrifugación de cultivos bacterianos inducidos para la expresión de la proteína control Hys-PvALN (barras negras) y la proteína heteróloga Hys-PvP5N (barras grises). Se determinó la actividad nucleotidasa de los extractos en presencia de: molibdato amónico (1 mM), molibdato sódico (5 mM), DOC (0,013%, p/v), SDS (0,1%, p/v) y Tween20 (0,1%, p/v).

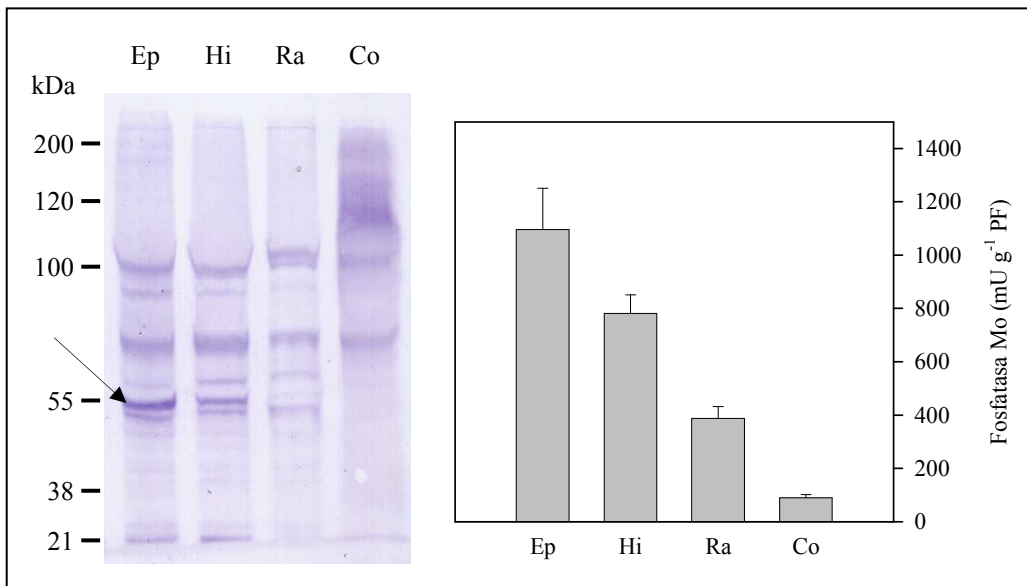
#### 4.5.- Anticuerpos policlonales obtenidos frente a la proteína recombinante Hys-PvP5N.

Los anticuerpos policlonales contra la proteína de fusión Hys-PvP5N purificada se generaron en conejo. El suero post-inmune obtenido reconoció, mediante análisis de Western blot, la proteína recombinante Hys-PvP5N utilizada en la inmunización, mientras que no se obtuvo ninguna señal utilizando el suero pre-inmune (Figura 55). Estos mismos sueros se utilizaron en el Western blot de extractos crudos obtenidos a partir de ejes de plántulas de judía y se obtuvieron varias bandas de inmunoreactividad específicas con el suero post-inmune. Una de ellas podría corresponder con la proteína 55 kDa que muestra actividad fosfatasa resistente a molibdato en los ensayos de actividad en gel. Para confirmarlo, se realizó una inmunodetección (Western blot) de los extractos de distintas partes de plántulas de judía de 6 días de desarrollo (Figura



**Figura 55.** Análisis del suero pre-inmune y post-inmune obtenido contra la proteína recombinante Hys-PvP5N. La técnica de Western blot se realizó con los sueros preinmune y post-inmune obtenido para la proteína Hys-PvP5N con la proteína purificada y extracto crudo de ejes de judía. La electroforesis SDS-PAGE se realizó al 8,5% de acrilamida y en condiciones reductoras. Los sueros se utilizaron en una relación de 1:5.000 en TTBS sin la adición de leche desnatada.

56). En los mismos extractos se determinó también la actividad fosfatasa resistente a molibdato con IMP como sustrato. Los anticuerpos policlonales inmunoreaccionaron con gran número de proteínas presentes en los extractos, pero se observó una correlación entre la intensidad de la banda señalada con una flecha y la actividad determinada *in vitro* (Figura 56).



**Figura 56. Análisis de expresión de la actividad fosfatasa resistente a molibdato en plántulas de 6 días.** En la parte izquierda se muestra el Western blot utilizando anticuerpos antinucleotidasa en condiciones no reductoras y sin calentar las muestras a 100 °C para los extractos obtenidos de la división de la plántula de judía en epicotilo (Ep), hipocotilo (Hi), raíz (Ra) y cotiledón (Co). En estos mismos extractos se determinó la actividad fosfatasa resistente a molibdato (parte derecha) con IMP como sustrato.



#### **IV.- DISCUSIÓN**



Los ureidos juegan un papel esencial como las principales moléculas transportadoras de nitrógeno en algunas leguminosas tropicales en condiciones de fijación, pero su rol como transportadores en otras situaciones con alta movilización de nitrógeno ha recibido menor atención. Los ureidos se detectaron en las semillas secas de judía (Figura 12), lo que podría ser la consecuencia del papel de estos compuestos como transportadores de nitrógeno durante el llenado de la semilla (Raso et al. 2007b). Igualmente, los ureidos podrían tener un papel fisiológico como moléculas de almacenamiento durante la germinación. En judía, durante la germinación *sensu stricto*, se produce un descenso en los niveles de ureidos y aminoácidos, lo que sugiere su uso como fuente de nitrógeno. La imbibición de las semillas conlleva la activación del metabolismo durante las etapas iniciales de la germinación. Durante esta fase se produce una movilización de reservas que provee de azúcares y aminoácidos al metabolismo recién iniciado, pero que es muy pequeña en comparación a la movilización que se produce tras la germinación (Nonogaki et al. 2010). La diferenciación entre germinación y desarrollo post-germinativo se observó fácilmente en la distribución de globulinas que se produce en judía entre los días 1 y 3 tras el inicio de la imbibición (Figura 10). La degradación de proteínas de reserva a lo largo del desarrollo en plántulas de varias especies, incluida judía, se ha estudiado y se ha concluido que en cotiledones se inicia una vez agotadas las reservas de estas proteínas en ejes (Tiedemann et al. 2000).

La concentración de ureidos incrementó en cotiledones y en ejes de judía tras la germinación (Figura 12), lo que podría indicar que *Phaseolus vulgaris* utiliza estos compuestos como moléculas para la movilización de nitrógeno durante el desarrollo de la plántula. Este incremento en ureidos fue comparativamente mayor que el producido en aminoácidos, aunque la concentración de ureidos fue inferior a la de aminoácidos totales en el periodo estudiado. La cantidad de ureidos totales por plántula a los 6 días de desarrollo fue de 3,5 veces mayor con respecto a la semilla seca mientras que la cantidad



de aminoácidos solubles se incrementó solo en 1,3 veces. Al expresar por g de peso fresco, la concentración de ureidos se incrementó, sobre todo tras la germinación (Figura 12), mientras que la de aminoácidos libres totales descendió inicialmente para mantenerse tras la germinación (Figura 11). La degradación de proteínas de reserva (globulinas) en cotiledones durante esta fase mantendría la concentración de aminoácidos. Además, el nitrógeno liberado contenido en los ureidos sería reasimilado en aminoácidos (Zrenner et al. 2006). Por lo tanto, existe un patrón diferente entre el metabolismo de ureidos y el de aminoácidos durante el desarrollo inicial de plántulas de judía.

Los ureidos producidos durante el desarrollo de plántulas de judía proceden de la oxidación de las purinas puesto que la inclusión de alopurinol al medio de imbibición redujo la concentración de ureidos en todos los tejidos (Figura 15-B y C). El nitrógeno derivado del metabolismo de ureidos puede ser importante para el desarrollo de las plántulas como se deduciría de la reducción de peso fresco de las plántulas desarrolladas en presencia de alopurinol (Figura 15-A). Con la concentración de alopurinol utilizada el efecto en el desarrollo fue pequeño y, por tanto, indicaría un papel poco importante de los ureidos. La concentración de inhibidor empleada fue aquella que tuvo efecto en la concentración de ureidos sin interferir enormemente en el desarrollo de las plántulas, puesto que concentraciones mayores producían un retraso muy importante en el desarrollo de estas.

Durante las últimas décadas ha existido una controversia sobre la ruta de degradación de ureidos en plantas, que ha girado fundamentalmente entorno al producto nitrogenado liberado: urea o amonio. Recientemente se ha señalado una ruta de degradación de ureidos en la que todo el nitrógeno es liberado sin la mediación de moléculas de urea (Serventi et al. 2010; Werner y Witte 2011). Sin embargo, los datos en leguminosas apuntan hacia una dependencia parcial de la ureasa en la ruta de degradación (Muñoz et al. 2001; Todd y Polacco 2004; Muñoz et al. 2006; Todd et al. 2006; Muñoz et al. 2011). En germinación, la

inclusión en el medio de imbibición de un inhibidor de la ureasa (PPD) no afectó a la acumulación de ureidos ni al desarrollo de las plántulas (Figura 15). En *Arabidopsis*, sin embargo, las semillas almacenadas durante 4 años presentaron una inhibición de la germinación en presencia de PPD, que revertía al introducir una fuente externa de nitrógeno (Zonia et al. 1995). Este hecho pone de manifiesto la importancia de la ureasa para el reciclaje del nitrógeno contenido en la urea. En judía, el inhibidor sí produjo un aumento de la concentración de urea en la plántula, siendo mayor en cotiledones (Figura 16). La urea juega un papel como fuente primaria de nitrógeno tomada activamente del suelo por las plantas, pero también es un intermediario en el catabolismo de la arginina en procesos de movilización de nitrógeno desde tejidos fuente (Witte 2011). Durante la germinación de soja, se produce un incremento de la actividad arginasa (Goldraij y Polacco 1999) y la arginina es degradada en la mitocondria (Goldraij y Polacco 2000), generando ornitina y urea. En muchas plantas, la arginina es el metabolito más importante en el almacenamiento de nitrógeno en semillas (Vanetten et al. 1967). Los niveles de aminoácidos solubles detectados inicialmente (Figura 11) y la degradación de proteínas de reserva (Figura 10) serían las fuentes de este aminoácido y, como consecuencia, tras su degradación, de la urea acumulada. En las plántulas tratadas con PPD, la actividad ureasa remanente en los extractos podría ser suficiente para mantener un nivel de degradación de urea que no afecte a la germinación y desarrollo de la plántula, pero sí produzca una acumulación de ella.

La importancia del nitrógeno para las plántulas de judía en crecimiento queda patente por el incremento en el desarrollo del eje embrionario tras añadir nitrato al medio de imbibición (Tabla 2). Esta incorporación no afectó a la cantidad de ureidos en ejes durante el desarrollo temprano, lo que sugiere que la síntesis de ureidos es independiente de la presencia de nitrato en el medio. Lo mismo se ha descrito en soja, donde incluso se produjo un aumento de la concentración de ureidos en ejes de plántulas tras 10 días en presencia de nitrato

en el medio (Polayes y Schubert 1984). Por su parte, la expresión del gen de la alantoinasa en *Robinia pseudoacacia* (Yang y Han 2004) y en *A. thaliana* (Werner et al. 2008) se reprimió en presencia de nitrato durante el desarrollo de plántulas, aunque en estos estudios no se determinó la concentración de ureidos. En judía, durante la floración y el llenado inicial de las semillas se produce un incremento del nivel de ureidos independientemente de si la planta está nodulada o se utiliza nitrato como fuente de nitrógeno y se ha sugerido la movilización de nitrógeno a partir de tejidos en senescencia como origen de estos ureidos (Thomas et al. 1979, 1980; Diaz-Leal et al. 2012). La disponibilidad de sacarosa durante el desarrollo temprano de judía no afectó a la concentración de ureidos ni a su crecimiento (Tabla 2). Sin embargo, la adición de sacarosa si provocó una reducción de la concentración de ureidos en cotiledones de *Arabidopsis* (Martin et al. 2002). En esta planta, el balance carbono-nitrógeno más que el contenido de carbohidratos tendría un papel predominante en la regulación del crecimiento de las plántulas (Martin et al. 2002).

La importancia del metabolismo de los ureidos en semillas de judía también se deduce a partir del patrón de actividades enzimáticas involucradas en su metabolismo (Figura 13). La actividad alantoinasa ha sido previamente estudiada en soja (Polayes y Schubert 1984) y en *Robinia pseudoacacia* donde también se estudió la expresión diferencial del gen durante la germinación y el desarrollo inicial de las plántulas (Yang y Han 2004). Sin embargo, es la primera vez que las actividades que catalizan la degradación del alantoato y ureidoglicolato se estudian durante la germinación. Las actividades que catalizan la degradación de la alantoína y el alantoato se detectaron en los extractos crudos obtenidos a partir de semillas secas de judía, mientras que no se detectó la actividad que cataliza la degradación de ureidoglicolato (Figura 13). Los patrones de las actividades enzimáticas en cotiledón y ejes durante el desarrollo de plántulas apoyan el papel propuesto para los ureidos como moléculas

utilizadas para la movilización de nitrógeno desde los cotiledones hasta los ejes (Polayes y Schubert 1984). La ausencia de actividad degradadora de ureidoglicolato en cotiledones indica que este tejido es incapaz de liberar todo el nitrógeno contenido en los ureidos y que, al menos parte de éste, sería liberado en los ejes en desarrollo. De acuerdo con esta función, las tres actividades están presentes en niveles altos en ejes embrionarios durante la germinación y desarrollo post-germinativo temprano. Sin embargo, debe dejarse claro que los ejes tienen capacidad de sintetizar ureidos sin ninguna señal derivada de los cotiledones, ya que los ureidos se acumularon en ejes de plántulas a las que se habían eliminado los cotiledones (Figura 18-C y E). Además, puesto que esa acumulación es mucho menor en presencia de alopurinol, se confirma que dichos ureidos proceden de la oxidación de purinas que tiene lugar en los propios ejes (Figura 18).

El ácido alantoico representó casi la totalidad de los ureidos presentes en los extractos crudos de judía, siendo la alantoína inferior al 5%. Esto podría ser consecuencia de la alta actividad alantoínasa presente en plántulas de judía y, como se ha sugerido anteriormente (Thomas y Schrader 1981), la actividad que cataliza la degradación de alantoato sería el paso limitante en la degradación de ureidos en plántulas. Estas diferencias también se observan durante el desarrollo de plantas adultas de judía tanto a nivel de expresión como de actividad para ambas enzimas (Diaz-Leal et al. 2012).

La movilización del nitrógeno fijado como ureidos está restringida a un grupo pequeño de leguminosas. La razón de la existencia de esta estrategia no se conoce. La síntesis de ureidos desde el di-nitrógeno en nódulos es un mecanismo complejo en el cual al menos 20 enzimas diferentes se ven involucradas. Este hecho contrasta con las cuatro actividades que catalizan la síntesis de asparragina. A pesar de la complejidad bioquímica de la ruta metabólica, el coste en términos de ATP por átomo de N asimilado y el balance N:C de los ureidos (revisado por Todd et al. 2006) podría ayudar a entender la

estrategia de los ureidos. El metabolismo de ureidos también podría tener un papel crucial durante el desarrollo post-germinativo de algunas plantas. Aunque las proteínas contienen la mayoría del nitrógeno almacenado en semillas de leguminosas, otras moléculas ricas en nitrógeno como los ácidos nucleicos transcritos durante la maduración de la semilla están presentes en las semillas secas (Bewley 1997). El contenido de este tipo de ácidos nucleicos en semillas secas podría constituir una reserva de nitrógeno que, tras su movilización en forma de ureidos desde los cotiledones, se utilice para la síntesis de nuevos ácidos nucleicos y aminoácidos en ejes en desarrollo. El elevado incremento en ureidos producido durante la germinación en judía podría indicar que este papel necesitaría ser considerado.

En cotiledones de judía y soja, la concentración de ureidos incrementó durante el desarrollo post-germinativo mientras que se mantuvieron niveles bajos en cotiledones de las otras plántulas analizadas (Figura 8). Soja y judía se clasifican como plantas ureídicas al utilizar mayoritariamente los ureidos como molécula de transporte del nitrógeno fijado en nódulos hasta el resto de tejidos de la planta (Schubert 1986). Garbanzo presenta un comportamiento mixto al utilizar tanto ureidos como amidas en un porcentaje similar en el transporte del nitrógeno fijado (Thavarajah et al. 2005) y guisante es una planta amídica típica (Schubert 1986). Por lo tanto, a la vista del comportamiento de estas especies durante el proceso de fijación y de germinación podría existir una correlación entre la utilización de ureidos en cotiledones y en el transporte del nitrógeno fijado en plantas adultas. La diferenciación en plantas ureídicas puede tener otras implicaciones en el metabolismo del nitrógeno aparte del transporte del nitrógeno simbióticamente fijado desde los nódulos hasta las partes superiores de la planta.

El análisis comparativo del metabolismo de ureidos en garbanzo, soja y judía ha puesto de manifiesto diferencias importantes en estas especies. El papel de los ureidos en germinación se había estudiado previamente en soja (Polayes y

Schubert 1984), mientras que no existía información para judía y garbanzo. Con respecto a garbanzo, un incremento de ureidos por g de peso fresco de hasta 6 veces superior en cotiledones y ejes de judía y soja (ureídicas) (Figura 23), y niveles superiores de actividad alantoinasa, acorde con los niveles de ureidos, lo que indicaría la importancia de los ureidos para estas especies (Figura 24). En garbanzo, los niveles de ureidos y de actividad alantoinasa reflejan, al compararlos con los de soja y judía, el carácter pseudo-ureídico de esta especie y podría indicar un protagonismo intermedio por parte de los ureidos en el periodo de germinación en consonancia con lo descrito en plantas de garbanzo en fijación (Thavarajah et al. 2005).

La habilidad de las plantas para tolerar altas concentraciones de sal está determinada por múltiples rutas bioquímicas que facilitan la retención y/o adquisición de agua, protección de las funciones del cloroplasto y el mantenimiento de la homeostasis iónica (Parvaiz y Satyawati 2008). Estas rutas bioquímicas incluyen las implicadas en la síntesis de metabolitos osmóticamente activos, proteínas específicas y determinadas enzimas que controlan el flujo de iones, agua y soportan la eliminación de radicales libres de oxígeno (Parvaiz y Satyawati 2008). La presencia de NaCl en el medio de imbibición produjo una disminución del peso de ejes de judía (Figura 19-B), como se había observado previamente en otras especies como el caupi (Gomes et al. 2008) y que se había relacionado con el retraso producido en la movilización de reservas en los cotiledones (Voigt et al. 2009). En presencia de NaCl se produjo un aumento de la concentración de ureidos y de la actividad alantoinasa tanto en cotiledones como en ejes (Figura 20 y 21) que podría tener como función el aumento de la presión osmótica de los tejidos para evitar la pérdida de agua. El déficit de agua y la salinidad, especialmente bajo condiciones de alta intensidad lumínica o en combinación con otros estreses, altera la homeostasis de las células y causa un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Miller et al. 2010). Los ureidos se han relacionado con el alivio de los efectos de las moléculas ROS en

plantas (Brychkova et al. 2008). Mutantes de *Arabidopsis* deficientes en xantina deshidrogenasa, enzima clave en la biosíntesis de ureidos, acumulan xantina y presentan síntomas de senescencia tras ser sometidas a tratamientos de oscuridad, aumentando los niveles de ROS tras ser reexpuestas a luz. La inclusión de alantoína y alantoato redujo los niveles de ROS y, por tanto, los ureidos podrían tener un papel paliando los efectos de los ROS al favorecer la relación N:C de las células (Brychkova et al. 2008). La inducción de actividades enzimáticas implicadas en el control de las especies reactivas de oxígeno se ha correlacionado con la tolerancia a sal (Wahid et al. 2007; Abogadallah et al. 2010). Los efectos negativos del estrés salino en plantas de judía en crecimiento vegetativo se redujeron mediante pretratamiento con ácido abscísico (Khadri et al. 2006). Por el contrario, mutantes de *Arabidopsis* incapaces de acumular ácido abscísico en situaciones de estrés salino mostraron un fenotipo de tolerancia a NaCl que revertía al introducir ABA en el medio de germinación (Ruggiero et al. 2004). Se ha sugerido que el mecanismo que proporciona tolerancia a sal durante el proceso de germinación es diferente del mecanismo involucrado durante el crecimiento vegetativo (Abogadallah et al. 2010).

La etiolización de plántulas de judía dio lugar a las características asociadas a este proceso, aumento en la longitud y grosor del hipocótilo, y ausencia de clorofila. Estas plántulas presentaron niveles inferiores de ureidos y actividad alantoinasa (Tabla 3 y Figura 22). Como se ha indicado anteriormente, la introducción en el medio de los ureidos alantoína y alantoato redujo los efectos producidos por compuestos ROS en plantas de *Arabidopsis* deficientes en xantina deshidrogenasa tras reexponer a la luz (Brychkova et al. 2008). Este dato sugiere una relación entre fotosíntesis y producción de compuestos ROS. La menor producción de compuestos ROS debido a la ausencia de luz podría ser la causa de la menor cantidad de ureidos y la menor actividad alantoinasa al ser menores los requerimientos de ureidos.

La expresión heteróloga de una proteína en un sistema como *E. coli* y la inserción en esta de un epítipo, permite la obtención de grandes cantidades de proteína y su purificación mediante el uso de este. El ADNc que codifica una posible alantoinasa de judía (JQ282796) se expresó en *E. coli* y la proteína recombinante con colas de histidinas se purificó mediante cromatografía de afinidad. La proteína purificada se utilizó para la obtención de anticuerpos policlonales en conejo. En soja ya se habían desarrollado previamente anticuerpos frente a la proteína purificada a partir de cotiledones, e identificaron la alantoinasa en extractos crudos como una proteína de 30 kDa (Webb y Lindell 1993). Mediante estos anticuerpos se purificaron dos actividades en soja, una a partir de extractos de nódulos y otra de cotiledones (Bell y Webb 1995). Los anticuerpos obtenidos en este trabajo reconocieron en extractos crudos tres proteínas con pesos moleculares de 66, 40 y 37 kDa (Figura 28-B). Las dos inferiores coincidieron en tamaño con las actividades alantoinasa de judía purificadas a partir de frutos (Raso et al. 2007b) y la superior fue identificada por MALDI-TOF/TOF como alantoinasa, indicando así la existencia de 3 proteínas en judía. Esto implicaría cuatro posibilidades que se discuten posteriormente: la presencia de 3 genes diferentes, el procesamiento por “splaicing” alternativo del ARNm, la modificación post-traduccional de una proteína inicial o la combinación de las tres anteriores.

La función del gen que codifica la alantoinasa se confirmó en *Robinia pseudoacacia* y *Arabidopsis thaliana* mediante complementación de mutantes de levaduras (Yang y Han 2004) y de *Arabidopsis* (Werner et al. 2008). La disponibilidad reciente de los genomas completos de soja, judía y *Arabidopsis* permite identificar el número de genes que existe para una determinada actividad ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)). Mientras que en *Arabidopsis* se ha encontrado una única copia del gen de la alantoinasa, en soja se han identificado 4 y en judía 2 genes (*ALN1* y *ALN2*). Las secuencias depositadas en la base de datos codifican para proteínas de un tamaño muy similar: 55,4 kDa en *Arabidopsis*,



56,6 kDa en soja y 56,7 en judía. Por lo tanto, aunque las distintas proteínas inmunoreactivas pudieran proceder de diferentes genes, las proteínas sintetizadas a partir de los mismos deben de presentar el mismo tamaño, hecho que no sucede.

El análisis del ARNm de diferentes tejidos no apoyó el proceso de “splicing” alternativo como origen de las proteínas más pequeñas. Éstas podrían ser el resultado de la rotura durante el proceso de extracción y manipulación de una proteína de mayor tamaño. Sin embargo, los datos sugieren la síntesis de una proteína inicial que es procesada posteriormente mediante modificaciones post-traduccionales entre las que se destacaría la acción de una proteasa. Las proteínas deducidas a partir de estos genes presentan un péptido señal de localización de la proteína en retículo endoplásmico, localización que fue confirmada por (Werner et al. 2008). Las secuencias presentan un sitio de corte para eliminar dicho péptido, aproximadamente en el aminoácido 30, lo que produce una pérdida de unos 3,7 kDa (Figura 57). Adicionalmente existiría un nuevo proceso proteolítico que explicaría los tamaños observados en planta. La secuenciación del extremo amino terminal de la actividad alantoinasa purificada a partir de cotiledones de soja (Webb y Lindell 1993) apoya esta hipótesis al situar dicho extremo en el aminoácido 254 de la secuencia deducida del gen, formada por unos 512 aminoácidos para los cuatro genes (Figura 57). El tratamiento con N-glicosidasa demostró que la proteína de 66 kDa se encuentra ligeramente glicosilada (Figura 34). Esta modificación está también presente en las dos actividades de inferior peso molecular (Raso et al. 2007b) y se identifica un motivo de N-glicosilación mediante el algoritmo NetNGlyc 1.0 Server en las secuencias de proteína para los genes *ALN1* (Figura 57) y *ALN2* de judía. Esta modificación por N-glicosilación también se deduce para las proteínas codificadas por los 4 genes de soja y otros depositados en las bases de datos para otras especies.

```

1-.MDQFIWRVLPILLSILVSFLVFFYFQNSHTAQLYPLIKFPRSKCSLLPHHH.-50
51-.FWISSKRIVTPQGIISGSVEINEGRIVSVIEGYGKQGQSKQEEIIDYGDA.-100
101.-VVMPLGLIDVHVHLDEPGRTEWEGFDTGTRAAAAGGVTTVVDMPLNYPST.-150
151.-VSKETLKLKLDAAEDKIYVDVGFVWGLVPENALNLTILDDLLSAGVLGVK.-200
201.-SFMCPGSGINDFPMTTIDHIKAGLSVLAKYKRPIVVHAELOQDYGNHLDIN.-250
251.-DNRDPHDYLTYLNTRPPSWEEAAIRQLVGVSKDTGIGGPLEGAHVHIVHL.-300
301.-SDSSASLDLIKEAKSRGDSITVETCPHYLAFTSEEIPNGDTRFKCSPPIR.-350
351.-DAHNKDKLWEAVLEGHIDLLTTHSPTVPELKLLEEGDFLKAWGGISSLQ.-400
401.-FNLPTWSYGKKYGLTLEQLSLLWSKRPAALAGIESKGTIEVGNHADIVV.-450
451.-WQPEQEFDLDDNYPVFIKHYELSAYMGRRLSGEVLDTFVRGNLVFKDEKH.-500
501.-APAACGVQILAT.....-512

```

**Figura 57. Localización de las secuencias identificadas por diferentes métodos en la proteína codificada por el gen *ALN1*.** Con fondo rojo se indica el sitio de corte para la eliminación del péptido señal de localización en retículo endoplásmico predicho por el software TargetP 1.1 Server. Con fondo azul se indica el sitio de N-glicosilación predicho por software NetNGlyc 1.0 Server. Con fondo verde, la secuencia que corresponde con el extremo N-terminal secuenciado para una alantoinasa purificada a partir de cotiledones de soja (Webb y Lindell 1993). Con fondo amarillo se indican los fragmentos secuenciados a partir de la proteína alantoinasa IsoI purificada de frutos de judía (Raso et al. 2007b). Los fragmentos subrayados indican los péptidos identificados por la técnica MALDI-TOF/TOF de la proteína purificada por inmunoprecipitación

La proteína alantoinasa sobreexpresada en *E. coli* se encontró mayoritariamente formando cuerpos de inclusión y sólo una pequeña proporción como proteína soluble. Ninguna de estas formas presentó actividad alantoinasa, probablemente debido a la necesidad de modificaciones postraduccionales que no se realizan en un sistema de expresión procariota, como por ejemplo la N-glicosilación. También puede deberse a la falta de un entorno proteico adecuado. En este sentido, se ha propuesto el requerimiento de una proteína accesoria para la activación completa de la alantoinasa recombinante de *E. coli* sobreexpresada en la cepa C41(DE3) (Mulrooney y Hausinger 2003). La alantoinasa sobreexpresada no sería completamente activa en las células recombinantes debido a la insuficiente expresión de una proteína accesoria necesaria para la introducción y correcta unión del ión divalente (Mulrooney y Hausinger 2003),

de forma similar a lo que ocurre para la actividad ureasa (Mobley et al. 1995; Witte et al. 2005). Esta hipótesis se basa en la limitada accesibilidad al centro activo por parte de quelantes como el EDTA y en la baja recuperación de la actividad alantoinasa recombinante tras la adición del ión divalente a la mezcla de reacción. Sin embargo, las actividades purificadas en judía sí se inhibieron por EDTA (un 50 y un 40%) y la incubación con diferentes iones recuperó parcialmente la actividad (Raso et al. 2007b). Por tanto, si existe una proteína que favorezca la unión del ión divalente en judía, no parece ser tan imprescindible para la recuperación de la actividad.

La actividad alantoinasa es muy elevada en cubiertas (testa) de semillas en formación (Raso et al. 2007b). Los cotiledones en formación de soja crecen en un medio cuya única fuente de nitrógeno es la alantoína pero solo incorporan el 50% del nitrógeno producido en la degradación de ésta, quedando el resto en el medio en forma de amonio (Coker y Schaefer 1985). Sin embargo, la cubierta presentó altos niveles de actividad glutamina sintasa y alantoinasa (Coker y Schaefer 1985). En judía, se ha observado este mismo patrón de actividad alantoinasa indicando el importante papel que realiza la cubierta en la degradación y asimilación del nitrógeno transportado por los ureidos (Raso et al. 2007b). La proteína de 66 kDa aparece con mayor intensidad en cubierta de semillas, siendo casi imperceptible en el embrión en llenado. Esta proteína de 66 kDa se ha purificado en este trabajo mediante inmunoprecipitación utilizando extractos completamente desnaturizados y, por tanto, no se pudo determinar la actividad enzimática de dicha proteína. En el caso de soja, la enzima desnaturizada con urea 8 M pudo recuperar la actividad tras eliminación de la urea por diálisis (Bell y Webb 1995). Los intentos llevados a cabo para inmunoprecipitar en condiciones nativas no dieron resultado, posiblemente debido al hecho de que la proteína utilizada para la obtención de anticuerpos estaba desnaturizada y los anticuerpos obtenidos identifican epítomos o determinantes antigénicos que están ocultos en la proteína nativa. Mediante

cromatografía de intercambio iónico en DEAE se ha conseguido separar la proteína de 66 kDa de las otras alantoinasas utilizando extractos crudos obtenidos a partir de frutos (Figura 35). El análisis mediante la técnica de Western blot reveló que esta proteína se eluyó de la columna con alta concentración de NaCl y el análisis de actividad de estas fracciones reveló que presentaban actividad alantoinasa (Figura 35, fracción 84).

Los anticuerpos obtenidos en este trabajo inmunoreaccionaron con diferentes proteínas de extractos de ejes y cotiledones de soja (Figura 31), entre ellas varias con masas moleculares similares a las purificadas previamente en esta especie (Webb y Lindell 1993; Bell y Webb 1995). El resto de proteínas presentaron masas moleculares superiores y, aunque no fue posible determinar sus actividades, su presencia en soja podría apoyar la hipótesis de que la actividad alantoinasa sufre diferentes modificaciones tras su síntesis. Recientemente se ha clonado en nuestro grupo un gen que codificaría una alantoinasa de garbanzo que presentaría una masa molecular de 55,2 kDa (Cabello, Pineda y Piedras, datos no publicados). En extractos de garbanzo, los anticuerpos también reconocieron varias proteínas de masas moleculares inferiores a las previstas (Figura 31).

El metabolismo de ureidos se induce durante el desarrollo post-germinativo de judía. Estos compuestos se sintetizan mediante la oxidación enzimática de las purinas, lo que implica la desfosforilación de nucleótidos, la hidrólisis de los correspondientes nucleósidos y la desaminación y oxidación de las bases de purina (Zrenner et al. 2006). El primer paso consiste en la desfosforilación del nucleótido y podría estar catalizado por una fosfatasa inespecífica o una 5' nucleotidasa específica. Se ha descrito que las fosfatasas ácidas pueden desfosforilar *in vitro* mononucleótidos como AMP (Penheiter et al. 1997; Ferreira et al. 1998; García et al. 2004), GMP (Penheiter et al. 1997; Leelapon et al. 2004) y UMP (García et al. 2004). Igualmente, otras actividades como las fitasas y fosfatasas ácidas púrpuras pueden producir la hidrólisis del

grupo fosfato de los nucleótidos (Greiner 2002; Lung et al. 2008; Kuang et al. 2009). La gran diversidad de sustratos potenciales y el gran número de actividades fosfatasa ácida presentes, complican la identificación de funciones específicas para cada una. En *Arabidopsis*, se han identificado al menos 29 secuencias diferentes en el genoma que codificarían fosfatasas ácidas púrpuras, constituyendo el grupo de fosfatasas más numeroso en este organismo (Tran et al. 2010). En ejes en desarrollo de judía se llevó a cabo un escrutinio de actividades fosfatasas utilizando como sustrato el nucleótido IMP mediante ensayo en gel, que permite la identificación de las actividades mayoritarias en las condiciones de ensayo. El objetivo fue el análisis de estas actividades durante la germinación y desarrollo inicial de judía, y su posible implicación en la síntesis de ureidos durante este periodo.

Se ha utilizado el IMP como sustrato fundamental al ser el producto final de la ruta de síntesis de purinas y punto común en la interconversión entre las distintas purinas (Zrenner et al. 2006). El sustrato sintético pNPP se utilizó como indicador de actividad fosfatasa al ser un sustrato universal de dicha actividad (Takai y Mieskes 1991). En los extractos de eje se detectaron dos bandas mayoritarias de actividad de 55 kDa y 110 kDa que se diferenciaron en la sensibilidad a molibdato y en la especificidad al nucleótido (Figura 36). La actividad de 55 kDa fue resistente al molibdato y mostró mayor especificidad frente al IMP. Las fosfatasas ácidas de plantas se inhiben fuertemente por análogos del fosfato como el molibdato (Duff et al. 1994), por lo que la resistencia a molibdato es una propiedad novedosa para estas enzimas. En leguminosas ureídicas se han caracterizado varias fosfatasas inhibidas por molibdato y con tamaños similares a 110 kDa. Así, se ha purificado parcialmente una actividad fosfatasa a partir de hojas (123 kDa) y nódulos (110 kDa) de judía (García et al. 2004). En ejes embrionarios de judía de 3 días se purificó una actividad fosfatasa de 96 kDa y que presentó actividad cloroperoxidasa dependiente de vanadato (Yoneyama et al. 2004). En semillas

secas de soja se purificaron 3 isoformas de fosfatasa ácida con masas moleculares muy cercanas a 55 kDa: AP1 (51 kDa), AP2 (58 kDa) y AP3A (52 kDa) (Ferreira et al. 1998). Sin embargo, estas últimas se purificaron a partir de semillas y presentaron inhibición en presencia de molibdato.

El sistema de actividad en gel proporciona información sobre cuántas actividades mayoritarias se encuentran en el extracto a analizar y la actividad relativa de cada una de ellas, así como el posible efecto producido sobre estas por parte de distintos sustratos e inhibidores. Los ensayos de actividad en gel se realizaron añadiendo SDS a los geles y al tampón de electroforesis por lo que las actividades observadas fueron resistentes. Se ha descrito que la fosfatasa ácida purificada a partir del hongo *Penicillium chrysogenum* (Haas et al. 1991) y las tres actividades fosfatasas ácidas purificadas a partir de plántulas de *Arachis hypogaea*, PI, PIIa y PIIb (Gonnety et al. 2006), se inhiben por SDS a una concentración de 0,1% p/v. Así, las diferencias observadas entre el sistema colorimétrico y el sistema en gel en las mismas condiciones se interpretaron como procesos de inhibición o desactivación de las diferentes actividades fosfatasas presentes en un extracto crudo como consecuencia de la presencia de SDS en el gel de acrilamida.

Las dos actividades descritas incrementaron tras la emergencia de la raíz en ejes embrionarios (Figura 37), coincidiendo con el incremento en la acumulación de ureidos (Figura 12). Sin embargo, la actividad de 55 kDa se detectó en gel en estadios más tempranos y se correlacionó mejor con el incremento de ureidos. Este dato podría indicar la implicación de esta actividad en el incremento de ureidos observado durante la germinación y posterior desarrollo de la plántula.

Con todos los nucleótidos ensayados (purínicos y pirimidínicos), exceptuando el AMP, se ha observado actividad en gel correspondiendo a la proteína de masa molecular de 55 kDa. Recientemente, hemos comprobado que la proteína de 55 kDa si cataliza la hidrólisis de AMP aunque el pH óptimo con

este sustrato es ligeramente superior al mostrado con el resto de los nucleótidos y, además, la actividad se inhibió parcialmente a la concentración de AMP utilizada en el ensayo en gel (5 mM) (Cabello-Díaz et al. 2012). Nucleotidasas purificadas a partir de membrana plasmática (Sharma et al. 1986) y de aparato de Golgi (Mittal et al. 1988) de *Arachis hypogaea* junto con una nucleotidasa descrita en judía (Lai et al. 1971), catalizan la hidrólisis de AMP pero no la del resto de nucleótidos y todas ellas se obtuvieron a partir de cotiledones. En microsomas de tallo de plántulas de maíz, se ha descrito la purificación de una actividad nucleotidasa que cataliza la hidrólisis de todos los nucleótidos, presentando mayor actividad con nucleótidos purínicos que con pirimidínicos (Carter y Tipton 1986). Sin embargo, no presentó actividad en presencia de pNPP ni se estudió la posible resistencia a molibdato. Dicha actividad estaba formada por un dímero con un peso aproximado de unos 50 kDa (Carter y Tipton 1986).

Con los nucleótidos XMP e IMP se obtuvieron las bandas de mayor intensidad en gel (Figura 41). Este dato va en concordancia con la idea de que la xantosina e inosina son intermediarios de la principal ruta catabólica de purinas (Zrenner et al. 2006). Con el objetivo de buscar otras actividades 5'-nucleotidasas en los ejes en desarrollo se analizó la actividad en gel durante el desarrollo de la plántula de judía frente a una purina (GMP) y una pirimidina (CMP) (Figura 42), así como el análisis con los dos sustratos de las fracciones obtenidas tras separar las proteínas de un extracto crudo en DEAE (Figura 43), como se ha descrito para varias fosfatasa de soja (Ferreira et al. 1998) y para las actividades nucleotidasas de maíz (Chen y Kristopeit 1981). Los resultados obtenidos en ambos análisis (Figuras 42 y 43) corroboran la hipótesis de una única actividad enzimática mayoritaria resistente a molibdato en ejes de judía a lo largo del desarrollo temprano.

Como se ha indicado, en plantas se han estudiado muchas actividades 5'-nucleotidasa pero sus correspondientes genes aún no han sido identificados. El

uso de las bases de datos permite identificar dominios conservados en la secuencia en estudio. La identificación de estos puede ser la única pista hacia la función celular o molecular de una proteína, ya que indica similitud local o parcial a otras proteínas, algunas de las cuales pueden haber sido caracterizadas experimentalmente (Marchler-Bauer et al. 2011). En el caso de plantas, los genes identificados con función nucleotidasa no han sido caracterizados experimentalmente. La función se ha asignado por similitud de dominios con los genes de nucleotidasas de humano y ratón sí caracterizados. Este estudio se abordó con la intención clonar, expresar y verificar la función de un gen que codifique una actividad 5'-nucleotidasa de judía.

Se ha clonado un ADNc completo con homología a las secuencias de nucleotidasas depositadas en las bases de datos (Figura 48). El peso molecular deducido para la secuencia obtenida (37,8 kDa) fue inferior al peso molecular de la actividad detectada en ejes de plántulas de judía en desarrollo (55 kDa). Gran parte de las nucleotidasas descritas en plantas son glicoproteínas (Carter y Tipton 1986; Sharma et al. 1986; Doremus y Blevins 1988; Mittal et al. 1988; Yokoyama y Hirai 1989; Gupta y Sharma 1996), hecho que podría explicar la diferencia de peso existente entre la actividad determinada en los ejes en desarrollo y la deducida a partir de la secuencia clonada. Sin embargo, se describe una nucleotidasa purificada de trigo que no se unió a concanavalina-A, indicando así la ausencia de glicosilación (Chen y Kristopeit 1981).

La proteína codificada por el ADNc clonado (*PvP5N*) se localizaría en el citoplasma según el algoritmo de predicción TargetP 1.1 Server. Las actividades nucleotidasas descritas en plantas presentan un amplio rango de localizaciones subcelulares. Se han purificado o caracterizado en plantas a partir de membrana plasmática y aparato de Golgi (Sharma et al. 1986; Mittal et al. 1988; Gupta y Sharma 1996), de microsomas (Carter y Tipton 1986) y del citoplasma (Chen y Kristopeit 1981; Doremus y Blevins 1988; Yokoyama y Hirai 1989). En humanos, donde estas actividades se han estudiado en más detalle, tanto a nivel



bioquímico como de secuencia, se identifican 7 nucleotidasas, 5 de las cuales son citosólicas mientras que las otras dos se localizan una en la mitocondria y otra en la cara externa de la membrana plasmática (Bianchi y Spsychala 2003).

La secuencia aminoacídica deducida presentó dominios conservados que indican la pertenencia de la proteína a la superfamilia HAD, compuesta por L-2-haloácido dehalogenasas, epóxido hidrolasas, fosfomutatas, fosfoserine fosfatasas y nucleotidasas entre otras actividades (Burroughs et al. 2006). Se presentan los 4 motivos conservados M(I), M(II), M(III) y M(IV) descritos para la superfamilia HAD (Burroughs et al. 2006) (Figura 48, rectángulos de color rojo). Los restos aspartato del motivo M(I) están implicados en el mecanismo catalítico de gran número de miembros de la superfamilia HAD, entre los que se incluyen las nucleotidasas (Burroughs et al. 2006). En las nucleotidasas de humanos se describe un quinto motivo denominado MS (Rinaldo-Matthis et al. 2002), presente también en la secuencia clonada PvP5N (Figura 48), e implicado en el reconocimiento del sustrato.

Se identifican multidominios para la familia 5'Nucleotidasa de pirimidinas (UMPH-1, pfam05822) y el alineamiento con secuencias de nucleotidasas de pirimidinas de diferentes especies muestra una serie de aminoácidos altamente conservados (Figura 48). Entre ellos destacan los residuos Asp<sup>74</sup>, Asp<sup>76</sup>, Thr<sup>78</sup>, Lys<sup>236</sup>, Gly<sup>274</sup>, Asp<sup>275</sup> y Asp<sup>279</sup> al coincidir con los descritos para la nucleotidasa P5N de ratón donde delimitan el sitio activo (Bitto et al. 2006). Los residuos Asp<sup>74</sup>, Asp<sup>76</sup>, Asp<sup>275</sup>, además, producen la unión del sustrato en el sitio activo (Bitto et al. 2006). Sin embargo, la actividad clonada presentó la misma actividad en presencia de pirimidinas (CMP) como de purinas (AMP) (Figura 53). Este dato, junto con el hecho de que el grado de identidad de la secuencia de humanos y ratón es del 30%, podría sugerir que en plantas la secuencia clonada no es específica de pirimidinas

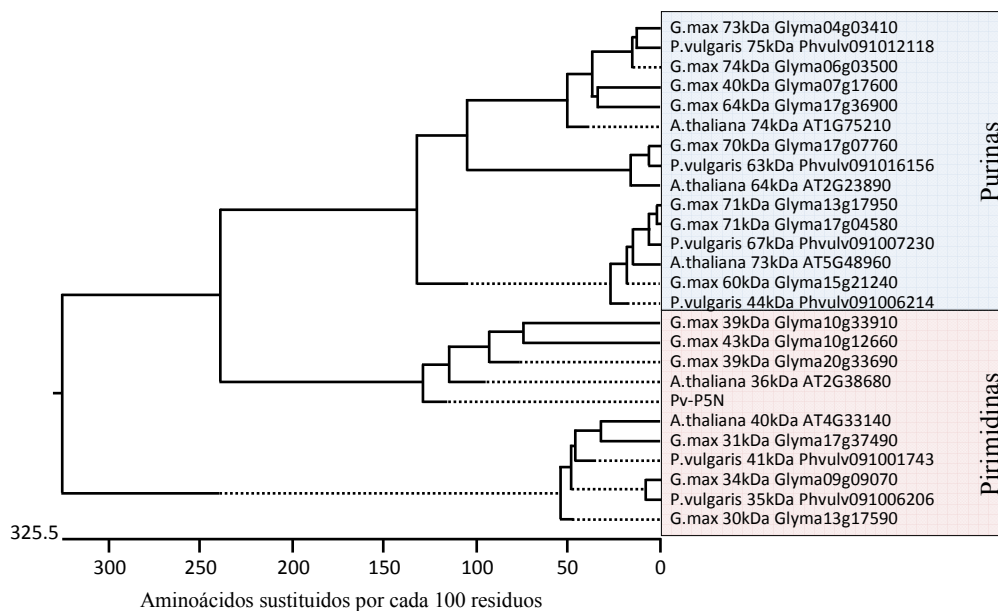
La proteína clonada presentó actividad en los extractos crudos de *E. coli* que la sobreexpresaban al utilizar el ensayo descrito por Amici et al. (2002) para

una nucleotidasa de pirimidinas de humanos. Sin embargo, en estas condiciones la proteína purificada no presentó actividad. En ningún caso, la proteína Pv-P5N expresada mostró actividad nucleotidasa en las condiciones de ensayo utilizadas para la actividad nucleotidasa de ejes. Los intentos de proteger o restaurar la actividad mediante la adición de  $Mg^{+2}$ , puesto que se ha descrito dependencia de este catión por parte de la nucleotidasa de ratón (Bitto et al. 2006), o la incubación de la enzima con el eluato de la purificación no fueron fructíferos, lo que sugiere que durante el proceso de purificación se produce una inactivación irreversible de la enzima.

Las actividad fosfatasa resistente a molibdato de ejes de judía presenta propiedades distintas a la actividad clonada presente en extractos de *E. coli*; las diferencias afectan a pHs óptimos, pesos moleculares e inhibición por SDS para la nucleotidasa clonada (Figuras 36, 38, 46 y 54). Esto sugiere que ambas actividades son distintas o que la falta de modificaciones postraduccionales de la proteína sobreexpresada en *E. coli* modifica sus propiedades.

Para la obtención de anticuerpos, la proteína clonada se purificó en condiciones desnaturalizantes debido a la baja eficiencia obtenida en condiciones no desnaturalizantes. Los anticuerpos generados identificaron varias proteínas en los extractos crudos de judía (Figura 56), lo que podría indicar la presencia de diferentes actividades con epítomos similares a los que se unirían los anticuerpos policlonales. Apoyando esta idea está el hecho de que la familia HAD presente motivos altamente conservados y la presencia de diferentes actividades fosfatasas purificadas y caracterizadas a partir de plantas. De manera más específica para nucleotidasas, se realizó una búsqueda en las bases de datos de los organismos recientemente secuenciados como *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris*, utilizando como base las secuencias de las 7 nucleotidasas descritas en humanos junto con la secuencia de la clonación de la actividad PvP5N. El alineamiento de las secuencias obtenidas (Figura 58) muestra 5 grandes grupos de nucleotidasas que se pueden estructurar en dos

atendiendo a la especificidad de sustrato (purinas o pirimidinas) de las secuencias de humanos utilizadas para su identificación. En soja se pueden encontrar hasta 8 posibles enzimas distintas para purinas y hasta 6 para pirimidinas. *Arabidopsis*, una no leguminosa, presenta 3 enzimas frente a purinas y 2 frente a pirimidinas. En judía se identifican hasta 7 genes que codifican una actividad nucleotidasa, 4 de los cuales podrían presentar cierta especificidad frente a purinas y 3 frente a pirimidinas. Ninguna de las secuencias encontradas para plantas han sido clonadas, expresadas y purificadas anteriormente.



**Figura 58.** Árbol filogenético con secuencias de posibles nucleotidasas. Secuencias aminoácidas de *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris* obtenidas en la base de datos *Phytozome*, se alinearon mediante el software *Lasergene-MegAlign* y el método *ClustalV*, representándose el árbol filogenético. La secuencia aminoácida de la proteína clonada *PvP5N* para una nucleotidasa de *Phaseolus vulgaris* fue idéntica a la encontrada en la base de datos con el nombre *Phvulv091027178*.

## **V.- CONCLUSIONES**



1.- Los ureidos adquieren una gran importancia durante la germinación y el posterior desarrollo de las plántulas ureídicas en comparación con otras plántulas. La especialización del metabolismo ureídico podría no ser exclusivo del transporte de nitrógeno fijado en plantas adultas y se sugiere que la implicación de ureidos en plántulas sometidas a diversas condiciones adversas es un aspecto a tener en cuenta en el estudio del papel de estos metabolitos.

2.- Las actividades alantoinasas purificadas hasta el momento podrían ser el resultado de las modificaciones postraduccionales a las que son sometidas las proteínas sintetizadas inicialmente. Entre estas modificaciones, la proteólisis sería la principal causa en el cambio de tamaño. Las implicaciones que estas modificaciones pueden tener sobre la regulación de la actividad alantoinasa son un campo para futuros estudios.

3.- Se ha caracterizado una actividad fosfatasa resistente a molibdato que utiliza como sustratos los nucleótidos monofosfato y cuyo patrón de inducción se correlaciona con la síntesis de ureidos.

4.- La presencia en la secuencia de la nucleotidasa PvP5N de todos los residuos considerados esenciales junto con los dominios conservados y la actividad fosfatasa frente a los sustratos CMP y AMP, permite concluir que el gen *PvP5N* codifica una nucleotidasa.



## **VI.- BIBLIOGRAFÍA**





Abogadallah GM y Quick WP (2009) Vegetative salt tolerance of barnyard grass mutants selected for salt tolerant germination. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 815-824

Abogadallah GM, Serag MM, El-Katouny TM y Quick WP (2010) Salt tolerance at germination and vegetative growth involves different mechanisms in barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) mutants. *Plant Growth Regulation* 60: 1-12

Amici A, Emanuelli M, Ruggieri S, Raffaelli N y Magni G (2002) Kinetic evidence for covalent phosphoryl-enzyme intermediate in phosphotransferase activity of human red cell pyrimidine nucleotidases. *Enzyme Kinetics and Mechanism, Pt F: Detection and Characterization of Enzyme Reaction Intermediates*. Academic Press Inc, San Diego, pp 149-159

Anzala F, Morere-Le Paven MC, Fournier S, Rondeau D y Limami AM (2006) Physiological and molecular aspects of aspartate-derived amino acid metabolism during germination and post-germination growth in two maize genotypes differing in germination efficiency. *Journal of Experimental Botany* 57: 645-653

Atkins CA (1991) Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. En "Biology and Biochemistry of nitrogen fixation" (Dilworth, M.J. y Glenn, A.R., eds.). Elsevier, Amsterdam.: 293-319

Atkins CA, Fernando M, Hunt S y Layzell DB (1992) A metabolic connection between nitrogenase activity and the synthesis of ureides in nodulated soybean. *Physiologia Plantarum* 84: 441-447

Atkins CA, Smith PMC y Storer PJ (1997) Reexamination of the intracellular localization of de novo purine synthesis in cowpea nodules. *Plant Physiology* 113: 127-135

Attucci S, Carde JP, Raymond P, Saintges V, Spiteri A y Pradet A (1991) Oxidative-phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiology* 95: 390-398

Baron K y Stasolla C (2008) The role of polyamines during in vivo and in vitro development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 44: 384-395

Barrero JM, Talbot MJ, White RG, Jacobsen JV y Gubler F (2009) Anatomical and transcriptomic studies of the coleorhiza reveal the importance of this tissue in regulating dormancy in barley. *Plant Physiology* 150: 1006-1021

Bell JA y Webb MA (1995) Immunoaffinity purification and comparison of allantoinases from soybean root-nodules and cotyledons. *Plant Physiology* 107: 435-441

Bewley JD (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066

Bianchi V y Spsychala J (2003) Mammalian 5'-nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry* 278: 46195-46198

Bitto E, Bingman CA, Wesenberg GE, McCoy JG y Phillips GN (2006) Structure of pyrimidine 5'-nucleotidase type 1 - Insight into mechanism of action and inhibition during lead poisoning. *Journal of Biological Chemistry* 281: 20521-20529

Boldt R y Zrenner R (2003) Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* 117: 297-304

Borisjuk L, Weber H, Panitz R, Manteuffel R y Wobus U (1995) Embryogenesis of *Vicia faba* L: Histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. *Journal of Plant Physiology* 147: 203-218

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254

Brychkova G, Alikulov Z, Fiuhr 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

Buckholz RG y Cooper TG (1991) The allantoinase (DAL1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 913-923

Bulbul N, Sakurai M, Matsushima H y Kaneko Y (2008) Induction of ultrastructural specialization for ureide metabolism in non-nodule soybean tissues cultured in vitro. *Plant Science* 175: 833-838

Burroughs AM, Allen KN, Dunaway-Mariano D y Aravind L (2006) Evolutionary genomics of the HAD superfamily: Understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. *Journal of Molecular Biology* 361: 1003-1034

Cabello-Diaz JM, Quiles FA, Lambert R, Pineda M y Piedras P (2012) Identification of a novel phosphatase with high affinity for nucleotides

monophosphate from common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 54-60

Campos A, Rijo-Johansen MJ, Carneiro MF y Fevereiro P (2005) Purification and characterisation of adenosine nucleosidase from *Coffea arabica* young leaves. *Phytochemistry* 66: 147-151

Cao YJ y Schubert KR (2001) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding soybean nodule IMP dehydrogenase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1520: 242-246

Carbonaro M (2006) 7S globulins from *Phaseolus vulgaris* L.: Impact of structural aspects on the nutritional quality. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70: 2620-2626

Carter SG y Tipton CL (1986) Purification and characterization of a 5'-nucleotidase from *Zea mays* microsomes. *Phytochemistry* 25: 33-37

Castle LA y Meinke DW (1993) Embryo-defective mutants as tools to study essential functions and regulatory processes in plant embryo development. *Seminars in Developmental Biology* 4: 31-39

Chen CM y Kristopeit SM (1981) Metabolism of cytokinin. Dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5' nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiology* 67: 494-498

Chen F, Dahal P y Bradford KJ (2001) Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. *Plant Physiology* 127: 928-936

Chiwocha SDS, Cutler AJ, Abrams SR, Ambrose SJ, Yang J, Ross ARS y Kermode AR (2005) The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant Journal* 42: 35-48

Coker GT y Schaefer J (1985) N-15 and C-13 NMR determination of allantoin metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiology* 77: 129-135

Cusa E, Obradors N, Baldoma L, Badia J y Aguilar J (1999) Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181: 7479-7484

Dasgan HY y Koc S (2009) Evaluation of salt tolerance in common bean genotypes by ion regulation and searching for screening parameters. *Journal of Food Agriculture & Environment* 7: 363-372

Datta DB, Triplett EW y Newcomb EH (1991) Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules: implications for the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 4700-4702

De Smet I, Lau S, Mayer U y Jurgens G (2010) Embryogenesis - the humble beginnings of plant life. *Plant Journal* 61: 959-970

Desimone M, Catoni E, Ludewig U, Hilpert M, Schneider A, Kunze R, Tegeder M, Frommer WB y Schumacher K (2002) A novel superfamily of transporters

for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 847-856

Diaz-Leal JL, Galvez-Valdivieso G, Fernandez J, Pineda M y Alamillo JM (2012) Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*. DOI: 10.1093/jxb/ers090

Doremus HD y Blevins DG (1988) Nucleoside diphosphatase and 5'-nucleotidase activities of soybean root-nodules and other tissues. *Plant Physiology* 87: 36-40

Duff SMG, Sarath G y Plaxton WC (1994) The role of acid-phosphatases in plant phosphorus-metabolism. *Physiologia Plantarum* 90: 791-800

Ehrenshaft M y Brambl R (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiology* 93: 295-304

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S y von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 300: 1005-1016

Ferreira CV, Granjeiro JM, Taga EM y Aoyama H (1998) Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 487-494

Finkelstein RR, Gampala SSL y Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15-S45

Fujino K, Sekiguchi H, Matsuda Y, Sugimoto K, Ono K y Yano M (2008) Molecular identification of a major quantitative trait locus, qLTG3-1, controlling low-temperature germinability in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 12623-12628

Gaines PJ, Tang L y Wisniewski N (2004) Insect allantoinase: cDNA cloning, purification, and characterization of the native protein from the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 203-214

Gan YB, Stulen I, van Keulen H y Kuiper PJC (2004) Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N-2 fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW g(-1) root dry weight) and specific N-2 fixation (N-2 fixed g(-1) root dry weight) in soybean. *Plant and Soil* 258: 281-292

García NAT, Olivera M, Iribarne C y Lluch C (2004) Partial purification and characterization of a non-specific acid phosphatase in leaves and root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 585-591

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD y Bairoch A (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31: 3784-3788

Gimeno-Gilles C, Lelievre E, Viau L, Malik-Ghulam M, Ricoult C, Niebel A, Leduc N y Limami AM (2009) ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: Modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Molecular Plant* 2: 108-119



Glevarec G, Bouton S, Jaspard E, Riou MT, Cliquet JB, Suzuki A y Limami AM (2004) Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 219: 286-297

Goldraj A y Polacco JC (1999) Arginase is inoperative in developing soybean embryos. *Plant Physiology* 119: 297-303

Goldraj A y Polacco JC (2000) Arginine degradation by arginase in mitochondria of soybean seedling cotyledons. *Planta* 210: 652-658

Gomes E, Lima C, Costa JH, da Silva ACM, Lima MDS, de Lacerda CF y Prisco JT (2008) Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. *Plant Cell Reports* 27: 147-157

Gonnety JT, Niamke S, Faulet BM, Kouadio E y Kouame LP (2006) Purification and characterization of three low-molecular-weight acid phosphatases from peanut (*Arachis hypogaea*) seedlings. *African Journal of Biotechnology* 5: 35-44

Greiner R (2002) Purification and characterization of three phytases from germinated lupine seeds (*Lupinus albus* var. Amiga). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6858-6864

Gupta A y Sharma CB (1996) Purification to homogeneity and characterization of plasma membrane and Golgi apparatus-specific 5'-adenosine monophosphatases from peanut cotyledons. *Plant Science* 117: 65-74

Haas H, Redl B, Leitner E y Stoffler G (1991) *Penicillium chrysogenum* extracellular acid phosphatase: purification and biochemical characterization. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1074: 392-397

Han B, Hughes DW, Galau GA, Bewley JD y Kermode AR (1997) Changes in late-embryogenesis-abundant (LEA) messenger RNAs and dehydrins during maturation and premature drying of *Ricinus communis* L seeds. *Planta* 201: 27-35

Harada T, Miyairi K y Murai N (2010) Trimeric glycoproteins of bean seed storage protein phaseolin were purified from baculovirus-infected insect Sf9 cells for use of structural study. *Plant Science* 179: 123-132

Hayashi S, Jain S, Chu RY, Alvares K, Xu B, Erfurth F, Usuda N, Rao MS, Reddy SK, Noguchi T, Reddy JK y Yeldandi AV (1994) Amphibian allantoinase: molecular cloning, tissue distribution, and functional expression. *Journal of Biological Chemistry* 269: 12269-12276

Herridge DF, Robertson MJ, Cocks B, Peoples MB, Holland JF y Heuke L (2005) Low nodulation and nitrogen fixation of mungbean reduce biomass and grain yields. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45: 269-277

Holdsworth MJ, Bentsink L y Soppe WJJ (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179: 33-54

Howell KA, Narsai R, Carroll A, Ivanova A, Lohse M, Usadel B, Millar AH y Whelan J (2009) Mapping metabolic and transcript temporal switches during

germination in rice highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. *Plant Physiology* 149: 961-980

Hunt C, Gillani N, Farone A, Rezaei M y Kline PC (2005) Kinetic isotope effects of nucleoside hydrolase from *Escherichia coli*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1751: 140-149

Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K y Kakimoto T (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063

Ishibashi N y Minamikawa T (1990) Molecular cloning and characterization of stored mRNA in cotyledons of *Vigna unguiculata*. *Plant and Cell Physiology* 31: 39-44

Jiang L y Kermode AR (1994) Role of desiccation in the termination of expression of genes for storage proteins. *Seed Science Research* 4: 149-173

Jung B, Florchinger M, Kunz HH, Traub M, Wartenberg R, Jeblick W, Neuhaus HE y Mohlmann T (2009) Uridine-ribohydrolase is a key regulator in the uridine degradation pathway of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 876-891

Kahn K, Serfozo P y Tipton PA (1997) Identification of the true product of the urate oxidase reaction. *Journal of the American Chemical Society* 119: 5435-5442

Kahn K y Tipton PA (1998) Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction. *Biochemistry* 37: 11651-11659

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

Katahira R y Ashihara H (2006) Profiles of purine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta* 225: 115-126

Katewa SD y Katyare SS (2003) A simplified method for inorganic phosphate determination and its application for phosphate analysis in enzyme assays. *Analytical Biochemistry* 323: 180-187

Kennedy RA, Rumpho ME y Fox TC (1992) Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiology* 100: 1-6

Khadri M, Tejera NA y Lluch C (2006) Alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*) by exogenous abscisic acid supply. *Journal of Plant Growth Regulation* 25: 110-119

Kim JH, Delauney AJ y Verma DPS (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

Koornneef M y Vanderveen JH (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* 58: 257-263

Kuang RB, Chan KH, Yeung E y Lim BL (2009) Molecular and biochemical characterization of AtPAP15, a purple acid phosphatase with phytase activity, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151: 199-209

Kurtz JE, Exinger F, Erbs P y Jund R (2002) The URH1 uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 41: 132-141

Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiha T, Kamiya Y y Nambara E (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *Embo Journal* 23: 1647-1656

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-&

Lai YF, Thompson JE y Barrell RW (1971) Changes in 5'-nucleotidase and glucose-6-phosphatase of *Phaseolus vulgaris* cotyledon tissue during germination. *Phytochemistry* 10: 41-&

Le Page-Degivry MT y Garello G (1992) In situ abscisic acid synthesis: a requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiology* 98: 1386-1390

Lee NG, Stein B, Suzuki H y Verma DPS (1993) Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic root-nodules retards peroxisome development and affects nitrogen availability to the plant. *Plant Journal* 3: 599-606

Leelapon O, Sarath G y Staswick PE (2004) A single amino acid substitution in soybean VSP alpha increases its acid phosphatase activity nearly 20-fold. *Planta* 219: 1071-1079

Leubner-Metzger G (2005) Beta-1,3-glucanase gene expression in low hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after ripening. *Plant Journal* 41: 133-145

Levenberg B (1964) Isolation and Structure of Agaritine, a Gamma-Glutamyl-Substituted Arylhydrazine Derivative from Agaricaceae. *Journal of Biological Chemistry* 239: 2267-2273

Linkies A, Graeber K, Knight C y Leubner-Metzger G (2010) The evolution of seeds. *New Phytologist* 186: 817-831

Lung SC, Leung A, Kuang R, Wang Y, Leung P y Lim BL (2008) Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry* 69: 365-373

Mahonen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN y Helariutta Y (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Development* 14: 2938-2943

Manfre AJ, LaHatte GA, Climer CR y Marcotte WR (2009) Seed Dehydration and the Establishment of Desiccation Tolerance During Seed Maturation is Altered in the *Arabidopsis thaliana* Mutant *atem6-1*. *Plant and Cell Physiology* 50: 243-253

Marchler-Bauer A, Lu SN, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke ZX, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang DC, Zhang NG, Zheng CJ y Bryant SH (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research* 39: D225-D229

Martin T, Oswald O y Graham IA (2002) *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon : nitrogen availability. *Plant Physiology* 128: 472-481

Masuda W, Fujiwara S y Noguchi T (2001) A new type of allantoinase in amphibian liver. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65: 2558-2560

Milanesi L, D'Angelo D y Rogozin IB (1999) GeneBuilder: interactive in silico prediction of gene structure. *Bioinformatics* 15: 612-621

Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S y Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment* 33: 453-467

Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y y Sun TP (2006) Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *Plant Journal* 45: 804-818

Mittal R, Das J y Sharma CB (1988) Purification and characterization of 5'-nucleotidase from the golgi-apparatus of peanut cotyledons. *Plant Science* 55: 93-101

Mobley HLT, Island MD y Hausinger RP (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological Reviews* 59: 451-480

Morohashi Y (1986) Patterns of mitochondrial development in reserve tissues of germinated seeds: A survey. *Physiologia Plantarum* 66: 653-658

Morohashi Y y Bewley JD (1980) Development of mitochondrial activities in pea cotyledons. Influence of desiccation during and following germination of the axis. *Plant Physiology* 66: 637-640

Mulrooney SB y Hausinger RP (2003) Metal ion dependence of recombinant *Escherichia coli* allantoinase. *Journal of Bacteriology* 185: 126-134

Muñoz A, Bannenberg GL, Montero O, Cabello-Diaz JM, Piedras P y Pineda M (2011) An alternative pathway for ureide usage in legumes: enzymatic formation of a ureidoglycolate adduct in *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Experimental Botany* 62: 307-318

Muñoz A, Piedras P, Aguilar M y Pineda M (2001) Urea is a product of ureidoglycolate degradation in chickpea. Purification and characterization of the ureidoglycolate urea-lyase. *Plant Physiology* 125: 828-834

Muñoz A, Raso MJ, 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

Nakabayashi K, Okamoto M, Koshihara T, Kamiya Y y Nambara E (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed



germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant Journal* 41: 697-709

Nambara E y Marion-Poll A (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science* 8: 213-217

Nambara E y Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56: 165-185

Nicolas G y Aldasoro JJ (1979) Activity of the pentose phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicer arietinum* L. *Journal of Experimental Botany* 30: 1163-1170

Nonogaki H, Bassel GW y Bewley JD (2010) Germination-Still a mystery. *Plant Science* 179: 574-581

Oracz K, Bouteau HEM, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F y Bailly C (2007) ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Journal* 50: 452-465

Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F y Bailly C (2009) The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* 150: 494-505

Ostergaard J, Larsen K y Jochimsen BU (1991) 5'-nucleotidase from soybean (*Glycine max*) root-nodules: Partial purification and characterization regulation in sterile tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 138: 387-393

Parkin DW, Horenstein BA, Abdulah DR, Estupinan B y Schramm VL (1991) Nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Metabolic role, purification, specificity, and kinetic mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 266: 20658-20665

Parvaiz A y Satyawati S (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses off plants - A review. *Plant Soil and Environment* 54: 89-99

Patrick JW y Stoddard FL (2010) Physiology of flowering and grain filling in faba bean. *Field Crops Research* 115: 234-242

Pelissier HC, Frerich A, Desimone M, Schumacher K y Tegeder M (2004) PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of French bean. *Plant Physiology* 134: 664-675

Penheiter AR, Duff SMG y Sarath G (1997) Soybean root nodule acid phosphatase. *Plant Physiology* 114: 597-604

Peoples MB, Sudin MN y Herridge DF (1987) Translocation of nitrogenous compounds in symbiotic and nitrate fed amide exporting legumes. *Journal of Experimental Botany* 38: 567-579

Pessoa J, Sarkany Z, Ferreira-da-Silva F, Martins S, Almeida MR, Li J y Damas AM (2010) Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* transthyretin-like protein. *Bmc Plant Biology* 10: 30

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G y Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786

Picciarelli P, Piaggese A, Ceccarelli N, Guglielminetti L y Alpi A (1994) Gibberellins in suspensor, embryo and integument from very young seeds of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Growth Regulation* 14: 183-185

Piedras P, Munoz A, Aguilar M y Pineda M (2000) Allantoate amidinohydrolase (allantoicase) from *Chlamydomonas reinhardtii*: Its purification and catalytic and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 378: 340-348

Pineda M (2004) Desarrollo y germinación de semillas. En "Resúmenes de Fisiología Vegetal". Servicio de Publicaciones Universidad de Córdoba: 181-186

Polayes DA y Schubert KR (1984) Purine synthesis and catabolism in soybean seedlings. The biogenesis of ureides. *Plant Physiology* 75: 1104-1110

Preston J, Tatematsu K, Kanno Y, Hobo T, Kimura M, Jikumaru Y, Yano R, Kamiya Y y Nambara E (2009) Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non dormant accessions. *Plant and Cell Physiology* 50: 1786-1800

Rai MK, Shekhawat NS, Harish, Gupta AK, Phulwaria M, Ram K y Jaiswal U (2011) The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 106: 179-190

Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C y Job D (2004) The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the

distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology* 134: 1598-1613

Ramazzina I, Folli C, Secchi A, Berni R y Percudani R (2006) Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nature Chemical Biology* 2: 144-148

Raso MJ (2008) Catabolismo de la alantoína y el alantoato en *Phaseolus vulgaris*. Tesis doctoral: Universidad de Córdoba

Raso MJ, Munoz A, Pineda M y Piedras P (2007a) Biochemical characterisation of an allantoate-degrading enzyme from French bean (*Phaseolus vulgaris*): the requirement of phenylhydrazine. *Planta* 226: 1333-1342

Raso MJ, Pineda M y Piedras P (2007b) Tissue abundance and characterization of two purified proteins with allantoinase activity from French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 131: 355-366

Raychaudhuri A y Tipton PA (2002) Cloning and expression of the gene for soybean hydroxyisourate hydrolase. Localization and implications for function and mechanism. *Plant Physiology* 130: 2061-2068

Raymond S, Tocilj A, Ajamian E, Li YG, Hung MN, Matte A y Cygler M (2005) Crystal structure of ureidoglycolate hydrolase (AllA) from *Escherichia coli* O157 : H7. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 61: 454-459

Reynolds PHS, Blevins DG y Randall DD (1984) 5-Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from soybean root nodules.

Kinetic and regulatory properties. Archives of Biochemistry and Biophysics 229: 623-631

Riegler H, Geserick C y Zrenner R (2011) *Arabidopsis thaliana* nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation. New Phytologist 191: 349-359

Rinaldo-Matthis A, Rampazzo C, Reichard P, Bianchi V y Nordlund P (2002) Crystal structure of a human mitochondrial deoxyribonucleotidase. Nature Structural Biology 9: 779-787

Ruggiero B, Koiwa H, Manabe Y, Quist TM, Inan G, Saccardo F, Joly RJ, Hasegawa PM, Bressan RA y Maggio A (2004) Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. Plant Physiology 136: 3134-3147

Salon C, Raymond P y Pradet A (1988) Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. Journal of Biological Chemistry 263: 12278-12287

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis TA (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. . Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sandoval JA, Huang ZH, Garrett DC, Gage DA y Chapman KD (1995) N-acetylphosphatidylethanolamine in dry and imbibing cottonseeds. Amounts, molecular-species, and enzymatic-synthesis. Plant Physiology 109: 269-275

Sarma AD, Serfozo P, Kahn K y Tipton PA (1999) Identification and purification of hydroxyisourate hydrolase, a novel ureide-metabolizing enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 274: 33863-33865

Schmidt A, Su YH, Kunze R, Warner S, Hewitt M, Slocum RD, Ludewig U, Frommer WB y Desimone M (2004) UPS1 and UPS2 from *Arabidopsis* mediate high affinity transport of uracil and 5-fluorouracil. *Journal of Biological Chemistry* 279: 44817-44824

Schubert KR (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants. Synthesis, transport, and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 37: 539-574

Schubert KR y Boland MJ (1990) The ureides. En "The Biochemistry of Plants" (Miflin, BJ y Lea PJ, eds) 16: 197-283

Seo M, Nambara E, Choi G y Yamaguchi S (2009) Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology* 69: 463-472

Serventi F, Ramazzina I, Lamberto I, Puggioni V, Gatti R y Percudani R (2010) Chemical basis of nitrogen recovery through the ureide pathway: formation and hydrolysis of S-ureidoglycine in plants and bacteria. *Acs Chemical Biology* 5: 203-214

Sharma CB, Mittal R y Tanner W (1986) Purification and properties of a glycoprotein adenosine 5'-monophosphatase from the plasma membrane fraction of *Arachis hypogaea* cotyledons. *Biochimica Et Biophysica Acta* 884: 567-577

Shutov AD, Baumlein H, Blattner FR y Muntz K (2003) Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. *Journal of Experimental Botany* 54: 1645-1654

Simonovic AD, Gaddameedhi S y Anderson MD (2004) In-gel precipitation of enzymatically released phosphate. *Analytical Biochemistry* 334: 312-317

Sliwinska E, Bassel GW y Bewley JD (2009) Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *Journal of Experimental Botany* 60: 3587-3594

Smith PM y Atkins CA (2002) Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128: 793-802

Smith PMC, Winter H, Storer PJ, Bussell JD, Schuller KA y Atkins CA (2002) Effect of short-term N-2 deficiency on expression of the ureide pathway in cowpea root nodules. *Plant Physiology* 129: 1216-1221

Solfanelli C, Ceron F, Paolicchi F, Giorgetti L, Geri C, Ceccarelli N, Kamiya Y y Picciarelli P (2005) Expression of two genes encoding gibberellin 2 and 3-oxidases in developing seeds of *Phaseolus coccineus*. *Plant and Cell Physiology* 46: 1116-1124

Sreenivasulu N, Usadel B, Winter A, Radchuk V, Scholz U, Stein N, Weschke W, Strickert M, Close TJ, Stitt M, Graner A y Wobus U (2008) Barley grain maturation and germination: Metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiology* 146: 1738-1758

Szuwart M, Starzynska E, Pietrowska-Borek M y Guranowski A (2006) Calcium-stimulated guanosine-inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Phytochemistry* 67: 1476-1485

Takai A y Mieskes G (1991) Inhibitory effect of okadaic acid on the para-nitrophenyl phosphate phosphatase activity of protein phosphatases. *Biochemical Journal* 275: 233-239

Thavarajah D, Ball RA y Schoenau JJ (2005) Nitrogen fixation, amino acid, and ureide associations in chickpea. *Crop Science* 45: 2497-2502

Thomas RJ, Feller U y Erismann KH (1979) Effect of different inorganic nitrogen sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* 82: 657-669

Thomas RJ, Feller U y Erismann KH (1980) Ureide metabolism in non nodulated *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* 31: 409-417

Thomas RJ y Schrader LE (1981) The assimilation of ureides in shoot tissues of soybeans. Changes in allantoinase activity and ureide contents of leaves and fruits. *Plant Physiology* 67: 973-976

Tiedemann J, Neubohn B y Muntz 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



Todd CD y Polacco JC (2004) Soybean cultivars 'Williams 82' and 'Maple Arrow' produce both urea and ammonia during ureide degradation. *Journal of Experimental Botany* 55: 867-877

Todd CD y Polacco JC (2006) AtAAH encodes a protein with allantoin amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 223: 1108-1113

Todd CD, Tipton PA, Blevins DG, Piedras P, Pineda M y Polacco JC (2006) Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany* 57: 5-12

Toker C (2004) Estimates of broad-sense heritability for seed yield and yield criteria in faba bean (*Vicia faba* L.). *Hereditas* 140: 222-225

Tran HT, Qian WQ, Hurley BA, She YM, Wang DW y Plaxton WC (2010) Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* 33: 1789-1803

Vander Willigen C, Postaire O, Tournaire-Roux C, Boursiac Y y Maurel C (2006) Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant and Cell Physiology* 47: 1241-1250

Vanetten CH, Kwolek WF, Peters JE y Barclay AS (1967) Plant seeds as protein sources for food or feed. Evaluation based on amino acid composition of 379 species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 15: 1077-&

Vogels GD y Van der Drift C (1970) Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry* 33: 143-&

Vogels GD y Van der Drift C (1976) Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriological Reviews* 40: 403-468

Voigt EL, Almeida TD, Chagas RM, Ponte LFA, Viegas RA y Silveira JAG (2009) Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. *Journal of Plant Physiology* 166: 80-89

Wahid A, Perveen M, Gelani S y Basra SMA (2007) Pretreatment of seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. *Journal of Plant Physiology* 164: 283-294

Webb MA y Lindell JS (1993) Purification of allantoinase from soybean seeds and production and characterization of anti-allantoinase antibodies. *Plant Physiology* 103: 1235-1241

Wells XE y Lees EM (1991) Ureidoglycolate amidohydrolase from developing french bean fruits (*Phaseolus vulgaris* L). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 287: 151-159

Werner AK, Romeis T y Witte CP (2010) Ureide catabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology* 6: 19-21

Werner AK, Sparkes IA, Romeis T y Witte CP (2008) Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoin amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiology* 146: 418-430

Werner AK y Witte CP (2011) The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends in Plant Science* 16: 381-387

Winkler RG, Blevins DG y Randall DD (1988) Ureide catabolism in soybeans. Ureidoglycolate amidohydrolase and allantoate amidohydrolase are activities of an allantoate degrading enzyme complex. *Plant Physiology* 86: 1084-1088

Witte CP (2011) Urea metabolism in plants. *Plant Science* 180: 431-438

Witte CP y Medina-Escobar N (2001) In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical Biochemistry* 290: 102-107

Witte CP, Rosso MG y Romeis T (2005) Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 1155-1162

Wojtyla L, Garnczarska M, Zalewski T, Bednarski W, Ratajczak L y Jurga S (2006) A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of Plant Physiology* 163: 1207-1220

Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y y Yamaguchi S (2004) Activation of Gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 16: 367-378

Yang J y Han KH (2004) Functional characterization of allantoinase genes from *Arabidopsis* and a nonureide-type legume black locust. *Plant Physiol* 134: 1039-1049

Yemm EW y Cocking EC (1955) The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst* 80: 209-213

Yokoyama ZI y Hirai H (1989) Purification and characterization of nucleotide specific phosphatases from soybean seeds. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 83-88

Yoneyama T, Shiozawa M, Nakamura M, Suzuki T, Sagane Y, Katoh Y, Watanabe T y Ohyama T (2004) Characterization of a novel acid phosphatase from embryonic axes of kidney bean exhibiting vanadate-dependent chloroperoxidase activity. *Journal of Biological Chemistry* 279: 37477-37484

Zehr BD, Savin TJ y Hall RE (1989) A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 182: 157-159

Zonia LE, Stebbins NE y Polacco JC (1995) Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol* 107: 1097-1103

Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U y Boldt R (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 805-836





**Abstract:**

French bean (*Phaseolus vulgaris*) is a legume that transports most of the fixed nitrogen from the nodules to the aerial parts as ureides. These compounds have a high N/C ratio, which makes them ideal for the transport and storage of nitrogen. Germination and seedlings growth are two crucial stages in the life cycle of plants. In these periods, plants are heterotrophic and they dependent on the reserves accumulated in the seeds. The plants become autotrophic before the nutrients are depleted.

In this work, we have studied nucleotide and ureide metabolism in French bean during germination and seedlings development. Dried common bean seeds accumulate ureides and they show high levels of allantoinase activity. After radicle protrusion, ureide metabolism is induced mainly in developing axes. The enzymatic activities involved in the degradation of ureides (allantoin, alantoate, and ureidoglicolate degrading activities) are induced in developing axes, suggesting a role of these compounds in the mobilization of nitrogen during germination and seedling growth. Antibodies against the common bean allantoinase were raised by using purified protein overexpressed in *Escherichia coli* and they recognize at least three proteins in crude extracts from common bean. The first step in the pathway from purines to ureides is catalysed by a phosphatase, which transforms nucleotides to nucleosides. A molybdate resistant phosphatase activity has been determined and characterized from developing axes. The values of phosphatase activity during germination and seedling development correlates with the ureide accumulation pattern. Molybdate-resistant phosphatase was determined with both purine and pyrimidine nucleotides as substrates. A cDNA encoding a putative pyrimidine nucleotidase was cloned from French bean. However, the overexpressed protein showed activity with both pyrimidines and purines as substrates.

**Resumen:**

La judía (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa que transporta la mayoría del nitrógeno fijado en los nódulos hacia las partes aéreas en forma de ureidos. Estos compuestos tienen una elevada relación N/C, lo que los convierte en moléculas ideales de transporte y almacenamiento de nitrógeno. La germinación y desarrollo postgerminativo son dos etapas cruciales en el ciclo de vida de las plantas. En estos periodos, las plantas son heterotróficas ya que dependen completamente de las reservas acumuladas en las semillas. Antes de que los nutrientes se agoten, las plántulas pasan a un metabolismo autotrófico.

En este trabajo se ha estudiado el metabolismo de ureidos y nucleótidos en plántulas de judía durante la germinación y desarrollo postgerminativo temprano. Las semillas de judía presentan niveles muy altos de ureidos además de elevados valores de actividad allantoinasa. Tras la emergencia radicular, se produce una inducción del metabolismo de ureidos principalmente en los ejes en desarrollo. Las actividades enzimáticas implicadas en la degradación de los ureidos alantoína, alantoato y ureidoglicolato se inducen en ejes en desarrollo, lo que sugiere un papel importante de estos compuestos en la movilización del nitrógeno durante la germinación y desarrollo postgerminativo. Se han obtenido anticuerpos frente a la proteína allantoinasa sobreexpresada en *E. coli*, que reconocen al menos tres proteínas en extractos de judía. En la ruta de síntesis de ureidos a partir de purinas, el primer paso estaría catalizado por una actividad fosfatasa que catalizaría la conversión de nucleótidos a nucleósidos. Se ha determinado y caracterizado una actividad fosfatasa resistente a molibdato, inhibidor de fosfatasa ácida, en ejes de judía y cuyo patrón temporal de actividad correlaciona con el aumento de ureidos. Se determinó actividad tanto con nucleótidos purínicos como pirimidínicos. Se ha clonado un ADNc que codifica una nucleotidasa con dominios similares a los de una nucleotidasa específica de pirimidinas. Sin embargo, la proteína sobreexpresada presentó actividad tanto con pirimidinas como purinas.



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal  
Sección de Fisiología Vegetal