

Capítulo 7

Biotecnología de plantas superiores y algas verdes

Pineda Priego M¹, Piedras Montilla P, Aguilar Urbano M, Muñoz Alamillo J, Quiles Luque FA, Sánchez Morán MV, Díaz Leal JL, Muñoz Gutiérrez A, Gálvez Valdivieso G, Fernández Conde E, Vera Postigo JM, Fernández Alvarez J, Raso Reyes MJ, Cardeñosa Parrado R

¹Dep. Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal, Fisiología Molecular y Biotecnología de Plantas, Campus de Rabanales, Edif. Severo Ochoa (C-6), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; Tel: 957218693; Fax: 957218358; ¹CE: <bb1pjprm@uco.es>

RESUMEN

Los ureidos, alantoína y alantoato, son los principales compuestos sintetizados a partir del nitrógeno fijado en los nódulos de las leguminosas que se exportan a las partes aéreas en leguminosas tropicales como la judía. Los ureidos se producen por la oxidación de las purinas sintetizadas de novo en los nódulos radicales y también como parte de un proceso de recuperación de los compuestos nitrogenados en tejidos senescentes. Los ureidos se acumulan en varios tejidos vegetales en respuesta al estrés hídrico, y se ha sugerido que la acumulación de estos compuestos nitrogenados es la responsable de la inhibición de la fijación de nitrógeno que tiene lugar en condiciones ambientales adversas. A pesar de la importancia crucial de los ureidos como compuestos de reserva y transporte de nitrógeno, hasta el momento no se llevado a cabo la caracterización de las rutas de síntesis y degradación de ureidos en plantas. En particular, parece que existen dos posibles rutas de degradación de alantoato, y que el que determinadas leguminosas usen una u otra ruta puede afectar a la sensibilidad o tolerancia de esas plantas a la sequía. Por tanto la determinación de la ruta que opera en leguminosas de gran interés agronómico como la judía y el garbanzo, puede a la larga tener utilidad biotecnológica con la obtención de plantas que sean capaces de mantener la fijación de nitrógeno en condiciones ambientales adversas, como la sequía. Además de en la caracterización, con fines biotecnológicos del metabolismo de ureidos en leguminosas, se está trabajando obtención de algas superproductoras de γ -tocoferol (vitamina E) mediante ingeniería metabólica, así como en el análisis del contenido en antioxidantes del aceite de oliva.

Palabras clave: tolerancia el estrés abiótico, caracterización molecular, patrones de expresión, bioproducción de vitaminas, polifenoles.

Introducción

El Grupo CVI-115 desarrolla su actividad investigadora en dos temas diferentes, ambos con potencial aplicación biotecnológica. Por una parte, se pretende encontrar los factores moleculares que determinan la diferenciación metabólica de las leguminosas en ureídicas y amídicas. Por otra, se ha iniciado recientemente una línea relacionada con la utilización de tocoferoles como antioxidantes naturales en la que se persigue la obtención de algas y plantas superproductoras de vitamina E.

Análisis de la síntesis y movilización de ureidos y amidas en leguminosas

Gran parte de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico se produce en los nódulos de las raíces de las leguminosas que se forman en la simbiosis con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Una vez incorporado a esqueletos carbonados, el nitrógeno fijado en estos nódulos se puede transportar hasta las partes aéreas de la planta en forma de amidas (glutamina y asparragina) o ureidos (alantoína y alantoato), lo que permite distinguir entre plantas amídicas (guisante, garbanzo, etc) y ureídicas (soja, judía, etc). La forma de

transporte depende no sólo del tipo de leguminosa sino también del estado de desarrollo de la planta.

Además, las plantas ureídicas sólo transportan ureidos cuando los compuestos nitrogenados proceden exclusivamente de la fijación biológica de N₂ que se lleva a cabo en los nódulos, de manera que se comportan como amídicas cuando se fertilizan con nitrato, y entonces la forma de transporte del nitrógeno orgánico es en forma de aminoácidos (glutamina y asparragina).

En general se ha prestado mucha atención a procesos como la fijación o la asimilación del nitrógeno, procesos esenciales para el desarrollo vegetal. Finalmente, el nitrógeno contenido en los ureidos o en los aminoácidos debe ser liberado para su reutilización en la síntesis de todos los compuestos con nitrógeno esenciales para la planta (ácidos nucleicos, otros aminoácidos, etc).

A pesar de su importancia, no se han estudiado todavía en profundidad a las rutas de degradación de los compuestos nitrogenados en plantas, y menos en leguminosas. En nuestro grupo analizamos las rutas de degradación de ureidos en judía, que es una planta ureídica, y en garbanzo, planta amídica, ambas leguminosas de gran

interés agronómico.

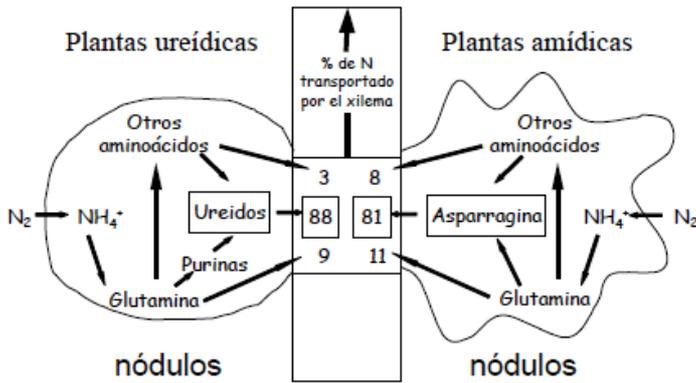


Figura 1. Síntesis y transporte de ureidos y aminoácidos en plantas ureídicas y amídicas. La mayoría del nitrógeno fijado en plantas ureídicas se exporta en forma de ureidos (alantoína y alantoato), mientras que en plantas amídicas lo hace en forma de amidas (asparragina y glutamina).

Búsqueda de los factores responsables de la diferenciación metabólica de las leguminosas en ureídicas y amídicas

En nuestro grupo hemos clonado genes que codifican tanto enzimas de la síntesis de amidas (asparragina sintetasa) como de ureidos (urato oxidasa), y estamos analizando la expresión de estos genes tanto en plantas amídicas como ureídicas, en distintas condiciones fisiológicas y de desarrollo.

Recientemente hemos abordado la caracterización de las enzimas responsables de la degradación de ureidos con objeto de estudiar la implicación de las mismas y de los ureidos en los procesos de desarrollo, tanto en plantas de judía como de garbanzo. En primer lugar se ha estudiado la enzima que cataliza la degradación de alantoína (alantoinasa) de judía (*Phaseolus vulgaris*). La actividad, detectada en diversos tejidos, se purificó a partir de frutos en desarrollo, donde presentaba los niveles más elevados.

A través de cromatografía de intercambio iónico se obtuvieron dos picos con actividad alantoinasa, que representa dos posibles isoformas con una diferencia en la movilidad electroforética de unos 5 kDa. También se ha clonado el ADNc que codifica la alantoinasa de judía y, sorprendentemente, el análisis de Southern-blot de ADN genómico reveló que el gen clonado se encuentra como copia única en judía. En la actualidad se está llevando a cabo la caracterización de la misma enzima en garbanzo, y se van a comparar los resultados en esta planta amídica con los obtenidos en judía.

Análisis molecular con fines biotecnológicos de la tolerancia a la sequía en judía.

En condiciones de estrés hídrico se produce rápidamente la inhibición de la fijación del N, y se cree que esta inhibición puede estar mediada por la acumulación de ureidos en las hojas ("ureide-feedback hypothesis"). No obstante, como aún no se han podido determinar la mayoría de las actividades enzimáticas del catabolismo de

ureidos en plantas, esta hipótesis está aún por confirmar.

Nuestro objetivo es caracterizar tanto a nivel molecular como bioquímico las posibles vías de degradación de ureidos en leguminosas, y estudiar los niveles de expresión y de actividad en condiciones normales y de estrés hídrico en plantas de judía. Para ello se han comenzado a clonar secuencias codificantes de cada uno de los posibles genes implicados en el metabolismo de ureidos, y en particular de los genes que codifican las enzimas encargadas de la degradación de alantoato, ya que se han descrito varias enzimas alternativas, que podrían degradar el alantoato hasta ureidoglicolato y este hasta amonio.

En concreto, se ha sugerido que la ruta de degradación de ureidos se bifurca en dos ramas a partir del alantoato, una que produciría urea, y una segunda que liberaría directamente amonio, y parece que las plantas que usan preferentemente cada una de estas ramas de la ruta difieren en su sensibilidad a la sequía. En estos momentos se ha purificado y caracterizado la última enzima de la ruta, que degrada el ureidoglicolato a glioxilato en frutos de garbanzo y de judía, y ha resultado ser enzimas de rama que libera urea. Pero en contra, hemos clonado el gen de una ureidoglicolato amidohidrolasa, que correspondería a la ruta que libera directamente amonio.

También hemos clonado el gen que codifica la alantoato amidohidrolasa, enzima que también libera amonio. Por tanto tenemos evidencias de que la ruta, al menos en judía opera tanto por la ruta amidohidrolasa, productora de amonio, como urea-liasa, que libera urea. También tenemos datos que corroboran la acumulación de ureidos en todos los tejidos analizados, en condiciones de sequía. La comparación en la expresión de los genes y la actividad de todas estas enzimas en condiciones de riego normal o de déficit hídrico nos permitirán aclarar si efectivamente las rutas de degradación de ureidos influyen en la tolerancia a la sequía, y si la acumulación de ureidos es o no la responsable de la inhibición de la fijación de nitrógeno en condiciones de déficit hídrico.

Obtención de algas y plantas superproductoras de γ -tocoferol (vitamina E) mediante ingeniería metabólica.

La capacidad antioxidante del α -tocoferol es unas 200 veces superior a la del butilhidroxitolueno (BHT), antioxidante alimentario usado habitualmente. La capacidad antioxidante de los isómeros β , γ , y δ es 1.5, 3 y 5 veces superior a la del isómero α . Nuestro objetivo es conseguir una fuente biológica con alto contenido en tocoferoles (fundamentalmente de γ -tocoferol) de forma que su extracción resulte económicamente rentable. Todas las plantas superiores tienen α -tocoferol en sus hojas y otras partes verdes, mientras que el γ -tocoferol (también el β - y el δ -tocoferol) está presente en concentraciones muy inferiores.

Desde un punto de vista metabólico, tanto el γ - como el α -tocoferol se producen a partir del ácido homogentísico y

