

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA, ECOLOGÍA
Y FISIOLOGÍA VEGETAL**



**Actividad nucleasa en judía y su relación con la
síntesis de ureidos durante la germinación y
senescencia**

Memoria presentada por Rocío Lambert Rodríguez para optar
al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

Director

A handwritten signature in blue ink, which reads "Pedro Piedras Montilla". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Pedro Piedras Montilla

Profesor Titular

TITULO: *Actividad nucleasa en judía y su relación con la síntesis de ureidos durante la germinación y senescencia*

AUTOR: *Rocío Lambert Rodríguez*

© Edita: UCOPress. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: ACTIVIDAD NUCLEASA EN JUDÍA Y SU RELACIÓN CON LA SÍNTESIS DE UREIDOS DURANTE LA GERMINACIÓN Y SENESCENCIA

DOCTORANDO/A: ROCÍO LAMBERT RODRÍGUEZ

INFORME RAZONADO DEL DIRECTOR 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 trabajo de Tesis Doctoral de Doña Rocío Lambert Rodríguez se ha realizado en el Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal, en el grupo "Biotecnología de plantas superiores y algas verdes" (PAIDI-115). Durante la realización de la Tesis, la doctoranda ha trabajado de forma constante para conseguir los objetivos marcados en el plan de trabajo, y ha adquirido el conocimiento de un gran abanico de técnicas en Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología Vegetal. La doctoranda ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como una gran vocación y una excelente aptitud ante los retos de la experimentación científica. La doctoranda ha adquirido finalmente una sólida formación que la capacita para abordar proyectos de investigación con total independencia, que abarca desde el diseño de experimentos hasta interpretación de los resultados y en la difusión de los mismos en el ámbito internacional.

Parte de los resultados de su trabajo han sido presentados en varios congresos científicos y han sido ya publicados en la revista internacional Plant Science situada 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, 15 de diciembre de 2015

Firma del director

Fdo.: 
Pedro Preckes

Parte de los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Lambert**, R., Quiles, F.A., Cabello-Díaz, J.M., Piedras, P. (2014) Purification and identification of a nuclease activity in embryo axes from French bean. *Plant Science* 224: 137-143.
- Pineda, M., Piedras, P., Alamillo, J.M., Aguilar, M., Gálvez-Valdivieso, G., Fernández-Alvarez, J., Raso, M.J., Quiles, F.A., Sánchez-Morán, M.V., Cabello-Díaz, J.M., Díaz-Leal, J.L., **Lambert**, R. (2009) Metabolismo de ureidos en judía. 978-84-7801-984-7. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba (España): 95-99.
- Piedras, P., **Lambert**, R., Raso, M.J., Pineda, M. (2009) Metabolismo de ureidos durante el desarrollo de fruto de judía (*Phaseolus vulgaris*). 978-84-8454-806-5. Editorial Club Universitario. Alicante (España): 153-158.

Asimismo, se han presentado en los siguientes congresos:

- **Lambert**, R., Raso, M.J., Pineda, M., Piedras, P. Metabolismo de ureidos durante el desarrollo de fruto de judía (*Phaseolus vulgaris*). IX Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Alicante (España). 2008.
- **Lambert**, R., Cabello-Díaz, J.M., Quiles, F.A., Piedras, P. Efecto del estrés salino sobre el metabolismo de ureidos durante la germinación y el desarrollo postgerminativo de judía. X Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Benalauría. 2010.
- **Lambert**, R., Cabello-Díaz, J.M., Quiles, F.A., Piedras, P. Nuclease activities during the germination and early seed development in French bean. XVIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. Valencia (España). 2010.

- **Lambert, R., Cabello-Díaz, J.M., Caballo, C., Quiles, F.A., Piedras, P.** Identificación de una nucleasa en ejes embrionarios de judía regulada por nitrato. XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Granada (España). 2014.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar a través de estas líneas mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de algún modo u otro me han ayudado a realizar esta tesis doctoral.

En primer lugar quisiera agradecer al Prof. Manuel Pineda Priego el permitirme realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación. Gracias por alentarme siempre a ser mejor y tus consejos.

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Prof. Pedro Piedras Montilla, el tiempo que ha dedicado a este trabajo, su ayuda y su esfuerzo. Muchas gracias por tu positividad y tu cariño, incluso en los momentos difíciles y, por animarme siempre a continuar con mi proyecto. Gracias también por tus consejos en el ámbito personal.

Quisiera trasladar mis palabras de agradecimiento al resto de los compañeros del grupo. A todos gracias, porque a pesar del esfuerzo requiere este trabajo, el compartir momentos divertidos, almuerzos y vida personal, lo ha hecho mucho más llevadero. A la Dra Josefa Alamillo por ayudarme cuando lo he necesitado, tanto en el laboratorio como en lo personal. Fran eres una de las personas más generosas que conozco, gracias por regalarme tu tiempo y por estar dispuesto a ayudarme siempre. Gracias por explicarme pacientemente protocolos, el funcionamiento de “aparatos” y por tu amistad. A mis compañeros de promoción, Juanmi gracias por esos buenos momentos en los que hemos compartido mesa y por tu apoyo. Juanlu gracias por tus consejos y ofrecerme tu ayuda siempre. Vicky gracias por tu apoyo, tu ayuda y tu cariño. Mi querida Inma, gracias por tu cariño y tu amistad, haber podido contar contigo en los últimos momentos de este trabajo tiene un gran valor para mí. Goyi gracias por tus consejos, por prestarme tu ayuda siempre que la he

necesitado y por compartir tus experiencias, me son de gran utilidad. Luis gracias por tu ayuda con la biología molecular y por tu amistad. Paco gracias por tu buen humor, tu apoyo y tu amistad. Marta muchas gracias por estar siempre disponible, por toda tu ayuda, y tus palabras de ánimo. Gracias a Almudena, Cristina, M^a Loli y Fernando por sacarme siempre una sonrisa y vuestro apoyo. Gracias Javi por tus recomendaciones.

Me gustaría agradecer a mis “vecinos” de planta aunque algunos ya no andan por aquí. Al grupo de “bacterias” Victor, Eva, Lara, Isa, M^a Paz y Rafa, Al grupo de “veternaria” Tina y Mary. A todos gracias por prestarme lo que he necesitado, y por supuesto vuestro cariño, gracias por esos momentos de charlas o intercambio de anécdotas. A Conchi e Inés, gracias por vuestra ayuda en cuestiones administrativas.

Gracias al equipo del Servicio central de Apoyo a la investigación (SACAI) de la Universidad de Córdoba por su apoyo técnico. Gracias a la financiación del Ministerio de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía (CVI1761), y Plan Andaluz de Investigación (Bio-115).

A continuación, quiero dar las gracias a aquellas personas que han confiado y contado conmigo en los últimos años, que ha supuesto casi de forma literal “un balón de oxígeno”, ya que me ha permitido llevar dinero a casa y, por tanto no tener que dejar mi proyecto aparcado de modo indefinido. A mis “niños de clases particulares” y por supuesto a sus padres, por confiar en mí y por su cariño. A mi familia de Zumaya. Gracias gloria Pareja por contar conmigo. Gracias Gloria Díaz, fuiste una buenísima compañera y hoy por hoy una gran amiga, muchas gracias por estar ahí siempre. Gracias al resto de mis compañeros Eva, Juan, Estela, Bárbara, Natalia, Silvia y Antonio, por compartir su sabiduría, por tantas muestras de cariño y vuestro apoyo. Gracias

a mis compañeros de la Federación de Natación Andaluza, por los divertidos momentos, vuestras palabras de ánimo y muestras de cariño.

A mi batallón de amigos, que están ahí siempre para celebrar conmigo los éxitos pero también para levantarme cuando me he caído. Gracias Ana S, Anabel, Ana M, Gema, Ana L, Dani, Juan y Javi. Gracias a mis amigos de Cruz Conde, Ana, Berta, Carre, Chur, Cristina, Dani, Libe, Luis, M^a Jose, M^a.Mar, María, Rocío, Rueda y Samuel. A todos vosotros gracias por animarme siempre a continuar con mi objetivo, por ayudarme en todo lo que he necesitado y por vuestra paciencia cuando no he dado señales de vida porque estaba inmersa en mi trabajo. A mis “habbibis” Adela y Lola, gracias por vuestro apoyo y amistad.

Gracias a toda la familia Soriano-Gómez, porque cada uno de vosotros habéis tenido mil detalles que me han ayudado y facilitado el camino durante todo este tiempo. Gracias por vuestro cariño y confianza en mí.

Gracias Pedro, esto no lo habría hecho sin ti. Gracias por estar ahí siempre ayudándome con todo, animándome y levantándome cada vez que me he caído. Gracias por tu paciencia cuando he tenido malos momentos o me he llevado los berrinches del trabajo a casa. Gracias por tu positividad y creer en mí.

Gracias a mis pilares más sólidos, mi familia. A mis padres por su apoyo incondicional. A M^a del Mar y Juanlu, Miriam, Iván. A Rafa y Marité, Carmen, Isabel e Isabeli. Gracias por vuestro apoyo, por animarme a continuar trabajando para llegar hasta el final de mi objetivo y por facilitarme todo cuanto ha estado en vuestra mano. Gracias por vuestro cariño y estar siempre ahí, sin vosotros nada de esto habría sido posible.

A mis padres

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XVII
	XIX
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
1. El nitrógeno como nutriente esencial para la vida de la planta	3
2. La judía común: <i>Phaseolus vulgaris</i> , una leguminosa ureídica	5
3. Moléculas orgánicas transportadoras de nitrógeno	6
3.1. Aminoácidos	6
3.2. Nucleótidos	7
3.3. Ureidos	9
4. Procesos fisiológicos con importante movilización de reservas y reciclaje de nutrientes	10
4.1. La germinación en leguminosas	10
4.2. La senescencia en las hojas	16
4.3. Floración, formación y maduración de frutos	21
5. Papel biológico de las nucleasas	23
5.1. Clasificación de las nucleasas que participan en procesos de muerte celular en plantas	24
5.1.1. Endonucleasas	24
5.1.1.1. Endonucleasas tipo S1	24
5.1.1.2. Endonucleasas tipo SNasa	26
5.2. Exonucleasas	27
6. Hipótesis y objetivos de la tesis	27
II. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Reactivos	31

1.1. Productos químicos y enzimas comerciales	31
1.2. Oligonucleótidos	31
2. Material biológico y condiciones de cultivo	31
2.1. Material vegetal	31
2.1.1. Imbibición de semillas y desarrollo postgerminativo	31
2.1.2. Cultivo de plantas	32
2.1.3. Experimentos fisiológicos	33
2.1.3.1. Análisis de actividad nucleasa y expresión de genes en ejes y cotiledones de plántulas de judía a lo largo de la germinación y desarrollo postgerminativo	33
2.1.3.2. Análisis de la actividad nucleasa en ejes y cotiledones de plántulas de varias leguminosas	33
2.1.3.3. Análisis de actividad nucleasa y expresión de genes en distintas partes de plántulas de judía	34
2.1.3.4. Efecto de la etiolización en ejes de judía	34
2.1.3.5. Tratamientos con fosfato, nitrato y alopurinol en ejes de judía	34
2.1.3.6. Efecto de las condiciones adversas en ejes de judía	35
2.1.3.7. Análisis de la movilización de reservas en cotiledones de judía	35
2.1.3.8. Análisis de diferentes órganos de planta adulta de judía	36
2.1.3.9. Análisis de la senescencia en hojas de judía	37
2.2. Cultivos bacterianos	38
2.2.1. Estipes bacterianas	38
2.2.2. Condiciones de cultivo	38
2.2.3. Obtención de células competentes de <i>E. coli</i>	39
3. Obtención de extractos crudos	39
3.1. Extractos crudos a partir de material vegetal	39
3.2. Extractos crudos a partir de <i>Escherichia coli</i>	39

4. Determinaciones analíticas	40
4.1. Determinación de la concentración de proteína soluble	40
4.2. Determinación de aminoácidos libres	41
4.3. Determinación de ureidos totales	41
4.4. Determinación de las globulinas	41
4.5. Determinación de las clorofilas	42
5. Ensayos enzimáticos	42
5.1. Determinación de la actividad nucleasa	42
5.1.1. Ensayo en gel	42
5.1.2. Ensayo <i>in vitro</i>	43
5.2. Determinación de la actividad ribonucleasa	44
5.2.1. Ensayo en gel	44
5.2.2. Ensayo <i>in vitro</i>	44
5.3. Determinación de la actividad alantoinasa	44
6. Electroforesis de proteínas	45
6.1. Separación de proteínas en gel de acrilamida	45
6.2. Tinción de los geles de acrilamida	46
6.2.1. Tinción con solución Azul de Coomassie	46
6.2.2. Tinción con solución de plata	47
7. Electrotransferencia y Western blot	47
8. Purificación de proteínas	48
8.1. Purificación de una proteína con actividad nucleasa a partir de ejes en desarrollo de judía	48
8.1.1. Precipitación fraccionada con sulfato amónico	49
8.1.2. Tratamiento térmico	49
8.1.3. Cromatografía de intercambio iónico	49
8.1.4. Cromatografía de afinidad a la concanavalina-A	50
8.2. Purificación de la proteína PVN2 recombinante	50
9. Diálisis de proteínas	51

10. Caracterización de la nucleasa de 37 kDa de ejes embrionarios de judía	51
10.1. Especificidad de sustrato	51
10.2. Determinación de la temperatura y pH óptimos	52
10.3. Efecto del EDTA y de cationes divalentes	52
10.4. Efecto de la concanavalina-A	53
10.5. Efecto del Pi y PPI	53
11. Caracterización e identificación de la nucleasa de 37 kDa purificada	53
12. Extracción y purificación de ácidos nucleicos	54
12.1. Aislamiento y purificación de ARN total	54
12.1.1. Extracción con TRI Reagent	54
12.1.2. Extracción con fenol caliente	55
12.1.3. Cuantificación, pureza e integridad del ARN	56
12.2. Aislamiento de ADN plasmídico	57
12.2.1. Lisis alcalina y precipitación por isopropanol	57
12.2.2. Kits comerciales	58
12.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN	58
13. Electroforesis de ácidos nucleicos	58
13.1. Electroforesis de ADN	58
13.2. Electroforesis de ARN	59
14. Síntesis de ADNc.....	59
14.1. Tratamiento con ADNasas	59
14.2. Expresión de actina	60
14.3. Reacción de retrotranscripción	60
15. Análisis de expresión de genes mediante RT-PCR semicuantitativa..	61
16. Clonación y expresión heteróloga de <i>PVN2</i>	62
16.1. Amplificación del ADNc de <i>PVN2</i>	62
16.2. Clonación de <i>PVN2</i> en pSpark y transformación de <i>E.coli</i>	63
16.3. Selección de los transformantes positivos	64

16.3.1. Análisis mediante PCR	64
16.3.2. Digestión con enzimas de restricción	64
16.4. Clonación del ADNc de <i>PVN2</i> en el vector pET30b(+)	65
16.5. Selección de transformantes positivos en BL21 (DE3) de <i>E.coli</i>	65
16.6. Inducción de la expresión de la proteína recombinante	66
17. Secuenciación de ácidos nucleicos	67
18. Transformación de células competentes	67
19. Base de datos y programas de análisis y de predicción	68
19.1. Base de datos	68
19.2. Programas de análisis y de predicción	68
III. RESULTADOS	69
CAPÍTULO 1. PURIFICACIÓN DE UNA NUCLEASA EN EJES DE PLÁNTULAS DE JUDÍA	71
1.1. Actividades nucleasa y ribonucleasa en ejes y cotiledones de judía durante la germinación y el desarrollo postgerminativo	73
1.2. Actividad nucleasa en plántulas de varias leguminosas	75
1.3. Caracterización de la actividad nucleasa de 37 kDa de ejes de judía	77
1.3.1. Especificidad de sustrato	77
1.3.2. Temperatura y pH óptimo	78
1.3.4. Efecto del EDTA y de cationes divalentes	78
1.3.5. Efecto de la concanavalina-A	80
1.3.6. Efecto del fosfato y pirofosfato	81
1.4. Purificación de la nucleasa de ejes de judía	81
1.5. Principales características de la nucleasa purificada	84
 CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE LA NUCLEASA PURIFICADA. ANÁLISIS DE LA FAMILIA S1/P1 EN JUDÍA	 87

2.1. Identificación de la proteína purificada de 37 kDa de ejes secuenciación <i>de novo</i>	89
2.2. Análisis de los transcritos del gen <i>PVNI</i>	91
2.3. Análisis de la secuencia del gen <i>PVNI</i>	94
2.4. Identificación y análisis de la familia S1/P1 nucleasas en judía	98
CAPÍTULO 3. ACTIVIDAD NUCLEASA Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS NUCLEASAS DE LA FAMILIA S1/P1 EN EJES DE JUDÍA	103
3.1. Nucleasas S1/P1 en ejes de judía durante la germinación y desarrollo postgerminativo temprano	105
3.2. Actividad nucleasa y expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 en ejes de plántulas etioladas de judía	107
3.3. Efecto del fosfato, nitrato y alopurinol en la actividad nucleasa y en la expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 en ejes de plántulas de judía	109
3.4. Efecto de condiciones adversas en la actividad nucleasa y expresión de la familia S1/P1 en ejes de plántulas de judía	111
CAPÍTULO 4. LAS ACTIVIDADES NUCLEASAS Y EXPRESIÓN DE NUCLEASAS DE LA FAMILIA S1/P1 DURANTE EL DESARROLLO DE LA PLANTA ADULTA DE JUDÍA	115
4.1. Actividades nucleasas y expresión de la familia S1/P1 en flores y frutos	117
4.2. Actividades nucleasas y expresión de la familia S1/P1 en hojas de judía	123
4.2.1. Desarrollo natural de la hoja	123
4.2.2. Senescencia inducida por oscuridad	126

CAPÍTULO 5. ACTIVIDAD NUCLEASA Y ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS NUCLEASAS DE LA FAMILIA S1/P1 DURANTE LA SENESCENCIA DE COTILEDONES	133
5.1. Movilización de reservas en cotiledones desde la imbibición hasta la senescencia	135
5.2. Nucleasas involucradas en la senescencia de cotiledones	136
5.3. Expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 durante el desarrollo de cotiledones	140
5.4. Efecto del rejuvenecimiento de cotiledones en las nucleasas	141
5.5. Efecto de la deficiencia de nutrientes sobre las nucleasas de cotiledones	143
CAPÍTULO 6. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA NUCLEASA <i>PVN2</i> EN <i>E. COLI</i>	147
6.1. Expresión del gen de la nucleasa <i>PVN2</i> en <i>E. coli</i>	149
6.2. Purificación de la proteína recombinante	150
IV. DISCUSIÓN	155
1. Estudio y purificación de una proteína con actividad nucleasa en ejes embrionarios de judía	157
2. Identificación de la nucleasa purificada en ejes. Análisis de la familia S1/P1 en judía	163
3. Nucleasas S1/P1 en ejes de judía	166
4. Nucleasas de la familia S1/P1 involucradas en procesos de muerte celular programada	169
4.1. Nucleasas involucradas en MCP durante el desarrollo de órganos	171
4.2. Nucleasas involucradas en MCP durante la senescencia	173

V. CONCLUSIONES	181
VI. BIBLIOGRAFÍA	185

ABREVIATURAS

ABA:	ácido abscísico
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNbc:	ADN bicatenario
ADNc:	ADN copia
ADNmc:	ADN monocatenario
APS:	persulfato de amonio
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
ARNr:	ácido ribonucleico ribosómico
ARNt:	ácido ribonucleico transferente
ATP:	adenosín trifosfato
BCIP:	fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol
BrEt:	bromuro de etidio
°C:	grado Celcius
DDI:	días después de la imbibición
DOC:	desoxicolato sódico
DTT:	1, 4-ditiotreitol
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
g:	aceleración de la gravedad
GA:	giberelina
h:	hora
IMP:	inosina monofosfato
ITPG:	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa:	kiloDalton
LB:	medio de Luria-Bertani
MCP:	muerte celular programada
MeJA:	metiljasmonato

min:	minutos
MES:	ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
MOPs:	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
NBT:	azul de tetrazolio
PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PF:	peso fresco
Pi:	fosfato inorgánico
PPi:	pirofosfato
ROS:	especies reactivas de oxígeno
rpm:	revoluciones por minuto
RT-PCR:	retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
SAG:	genes asociados a la senescencia
SDS:	dodecilsulfato sódico
SIO:	senescencia inducida por oscuridad
TBE:	tampón Tris-ácido bórico-EDTA
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
TES:	2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino] etanosulfónico
TRIS:	Tris-(hidroximetil)-aminometano
x-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- -D-galactopiranosido

RESUMEN

La judía es una leguminosa ureídica puesto que transporta el nitrógeno fijado en los nódulos hacia las partes aéreas en forma de ureidos, mientras que las leguminosas amídicas lo hacen en forma de amidas. Los ureidos presentan una alta eficacia como moléculas de transporte de nitrógeno por su elevado ratio N:C, por lo que también podrían ser usados como forma de transporte de nitrógeno en diferentes condiciones fisiológicas. Las nucleasas son enzimas que están implicadas en la degradación de ácidos nucleicos y la familia S1/P1 se ha involucrado en este proceso durante la muerte celular programada.

En esta Tesis se han analizado las actividades nucleasas y ribonucleasas en judía en diferentes procesos fisiológicos a lo largo de su desarrollo y se ha comparado con la concentración de ureidos. También se ha determinado la expresión de los genes que codifican las nucleasas de la familia S1/P1. En ejes en desarrollo de plántulas de judía se ha determinado una nucleasa mayoritaria, cuya actividad precede a la acumulación de ureidos que se produce en este tejido. La proteína con actividad nucleasa de ejes se ha purificado y se ha identificado el gen que la codifica, denominándose *PVNI*. Este gen pertenece a la familia S1/P1 junto con sus cuatro homólogos en judía. *PVNI* fue el gen de esta familia con expresión mayoritaria en plántulas de judía desarrolladas bajo diferentes condiciones. La demanda de nutrientes por parte del embrión podría regular la expresión de *PVNI*. Además, se han determinado las actividades nucleasas y expresión de los miembros de la familia S1/P1 de judía en varios procesos en los que se produce una significativa movilización de nutrientes, como son la senescencia de hojas y de cotiledones. En ambos procesos se observó un incremento en los valores de actividad de diferentes nucleasas, un aumento en la expresión de diferentes miembros de la familia S1/P1 y una acumulación de los ureidos. Durante senescencia de hojas se ha observado la inducción de los genes *PVN2* y *PVN5*, mientras que durante la senescencia de

cotiledones se indujo la expresión de *PVN4* y *PVN5*. Los productos de las reacciones de estas nucleasas podrían dar lugar a los ureidos y éstos transportarse a otras partes de la planta.

ABSTRACT

French bean is a ureide legume since it transports the fixed nitrogen in nodules to the aerial parts of the plants in form of ureides, whereas the amide legumes transport the fixed nitrogen as amides. The ureides have a high rate N:C being ideal nitrogen transport molecules, and they could have this role in others physiological processes. Nucleases are enzymes involved in the catabolism of nucleic acids and the S1/P1 family has been implicated in this process during programmed cell death.

In this Thesis the nuclease and ribonuclease activities have been analyzed in French bean along its development and they have been compared to ureide levels. The expression of the genes coding for S1/P1 nuclease family has been determined as well. In developing axes from French bean seedlings a major nuclease has been determined, whose activity precedes ureide accumulation in this tissue. A protein with nuclease activity has been purified and the gene that codify it has been identified and named *PVNI*. This gene along with others four form the S1/P1 family in French bean. *PVNI* was the predominant gene expressed in seedlings developed under several physiological conditions. The nutrient demand by embryos could regulate *PVNI* gene expression. In addition, the nuclease activities and gene expression have been determined in several processes with a significant nutrient mobilization, such as leaves and cotyledons senescence. In both processes, the activity of several nucleases and the expression of several genes of S1/P1 family increased, as well as the ureide concentration. During leaf senescence the genes *PVN2* and *PVN5* induced, whereas in cotyledon senescence the genes *PVN4* and *PVN5* increased its

expression. The products from the nuclease reactions could lead to ureide production and those could be transported to other part of the plant.

I. INTRODUCCIÓN

1. El nitrógeno como nutriente esencial para la vida de la planta

El nitrógeno es un elemento esencial para la vida de la planta (Prinsi y Espen 2015). Por su cantidad en la planta se considera un macronutriente y su porcentaje en peso seco oscila entre el 2 y el 5%. Se encuentra formando parte de biomoléculas tan importantes como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos, clorofila, vitaminas, coenzimas y hormonas. La deficiencia de nitrógeno conlleva un menor y ralentizado crecimiento, así como una mayor sensibilidad al ataque de patógenos o al estrés abiótico. Este déficit promueve además mayor desarrollo de la raíz y provoca clorosis en las hojas adultas ya que al ser un nutriente móvil se deriva a hojas jóvenes. También se reduce el número de flores y de frutos (Williams y Miller 2001). Sin embargo, el exceso de nitrógeno también resulta perjudicial para la planta causando un exceso en el tamaño y número de hojas, un desarrollo muy pobre de raíces, un retraso en la floración y escasa formación de frutos (Williams y Miller 2001). La planta equilibra los requerimientos nutricionales de éste con su disponibilidad modulando el metabolismo del nitrógeno, principalmente mediante la toma del NO_3^- , su reducción a NH_4^+ y su asimilación, así como su reciclaje tras el catabolismo de biomoléculas (Galloway *et al.* 2008; Prinsi y Espen 2015).

La mayoría de las plantas requieren entre 20 y 50 gramos de N para producir 1 kg de biomasa seca, normalmente en forma de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+). Esta cantidad supone un factor limitante de la producción en la mayoría de los cultivos (Robertson y Vitousek 2009) y, por este motivo en las últimas décadas se ha incrementado la producción y aplicación de fertilizantes nitrogenados a los cultivos. El uso de fertilizantes asegura una buena cosecha pero conlleva un acusado incremento en el coste de la producción en la agricultura acompañado además, de graves daños para el medio ambiente (Galloway *et al.* 2008). El exceso de compuestos nitrogenados afecta a la calidad del aire, agua y suelo, ya

que produce un aumento en la lixiviación provocando la eutrofización de los ríos y la acidificación de los suelos. Además se produce la liberación a la atmósfera de óxido nitroso y otros gases reactivos (Robertson y Vitousek 2009; Guo *et al.* 2010) Por este motivo resulta de gran importancia el desarrollo de una agricultura sostenible, planteando a la sociedad la necesidad de determinar el uso eficiente del nitrógeno por parte de la planta (NUE) (Xu *et al.* 2012). Incrementando el NUE puede reducirse la cantidad de fertilizantes, lo que conlleva importantes ventajas económicas y medioambientales (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010). No obstante, para alcanzar este objetivo es necesario ampliar el conocimiento en los procesos de absorción, transporte, movilización y reciclaje de nutrientes que acontecen durante el ciclo vital de la planta y que guardan estrecha relación con el NUE (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010). Junto con la removilización del nitrógeno, la fijación biológica de nitrógeno que pueden llevar a cabo las leguminosas resulta un interesante un objeto de estudio ya que permite un importante ahorro en el uso de fertilizantes.

El nitrógeno en la corteza terrestre está presente en un 0,1% mientras que en la atmósfera lo está en un 80%, aunque en forma de dinitrógeno que no resulta asimilable por todas las plantas. Las leguminosas no obstante, son capaces de asimilar el este dinitrógeno gracias a la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de N_2 , denominadas en su conjunto rizobios (Sprent 2002). Como consecuencia de dicha simbiosis se origina una estructura denominada nódulo, en cuyo interior se albergan los rizobios que mediante el complejo enzimático nitrogenasa reduce el N_2 a NH_4^+ . Este amonio es asimilado por la planta como fuente de nitrógeno y ésta a cambio suministra a las bacterias ácidos carboxílicos, principalmente malato, como fuente de energía (Lodwig y Poole 2003). El NH_4^+ rápidamente es asimilado a través del ciclo GS/GOGAT. El nitrógeno fijado se transporta hacia las otras partes de la planta en forma de

amidas en el caso de las leguminosas amídicas o bien en forma de ureidos en las leguminosas ureídicas (Atkins 1991).

2. La judía común: *Phaseolus vulgaris*, una leguminosa ureídica

La judía común recibe el nombre científico de *Phaseolus vulgaris* L. (Linneo 1753) y pertenece al género *Phaseolus*. Su enclave taxonómico es Clase *Dicotyledoneae*, Subclase *Rosidae*, Superorden *Fabanae*, Orden *Fabales*, Familia *Fabaceae* y Subfamilia *Papilionoidae* (Liu *et al.* 2011). *P. vulgaris* es una planta autógama, con un genoma relativamente pequeño (650 Mbp), diploide y con 11 cromosomas ($2n = 22$). En el genoma de judía no se han producido reordenaciones y duplicaciones cromosómicas complejas como las encontradas frecuentemente en otras leguminosas, como es el caso de la soja (Shoemaker *et al.* 1996; Gepts *et al.* 2008). La judía es el resultado de la evolución a partir de un ancestro silvestre cultivado en dos áreas geográficas del continente americano: zona Mesoamericana y zona Andina (Grenty 1969; Kaplan 1981; Brücher 1988). A partir de estos cultivos, denominados acervos o grupos de germoplasmas surgen seis razas más (Singh *et al.* 1988). El acervo andino origina las razas: Chile, Nueva Granada y Perú, mientras que el acervo Mesoamericano las razas: Durango, Jalisco y Mesoamérica. Con la llegada de los europeos el cultivo de la judía se expandió por el resto de los continentes. Actualmente los cultivares de mayor importancia económica pertenecen a las razas Durango, Mesoamérica y Nueva Granada.

La judía común es una de las leguminosas más cultivadas e importantes para el consumo, estimándose una producción de 23,1 millones de toneladas al año en unas 8,7 millones de hectáreas (FAO, 2014) (Esmailzadeh y Aminpanah 2015). La enorme utilidad de este cultivo radica en su gran valor nutricional que lo convierte en una importante fuente de alimento. Debido al alto contenido en proteínas en las semillas, así como micronutrientes o vitaminas

tan importantes como la biotina, proporciona grandes beneficios en la salud del consumidor (Broughton *et al.* 2003). Además de los valores nutricionales, su cultivo presenta ventajas económicas y ecológicas que radican en la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico al asociarse con bacterias del género *Rhizobium*.

3. Moléculas orgánicas transportadoras de nitrógeno

Las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución unos mecanismos eficientes para optimizar al máximo la disponibilidad de los nutrientes. En la célula vegetal las reacciones anabólicas y catabólicas están interconectadas de modo que los productos de degradación pueden ser transportados donde se requieran o bien acumularse para utilizarse en el momento adecuado. Esto supone un ahorro energético muy importante para la planta que no siempre puede tomar del suelo los nutrientes que precisa. La germinación o la senescencia son algunos de los procesos fisiológicos en los que se produce la hidrólisis de grandes biomoléculas como proteínas o ácidos nucleicos, que conlleva la liberación de diferentes compuestos nitrogenados (Zrenner *et al.* 2006). Éstos pueden incorporarse a su vez, a diferentes compuestos orgánicos por la acción de ciertas enzimas o transportarse a otros tejidos donde se requieran.

3.1. Aminoácidos

El amonio generado mediante varios procesos metabólicos (absorción directa por las raíces, reducción del nitrato, oxidación del glutamato, fotorrespiración o de la desaminación del glutamato) es muy tóxico para la célula por lo que rápidamente debe ser retirado del medio. Esto se lleva a cabo por la acción la acción secuencial de dos enzimas: la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (Liang *et al.*) que determinan el ciclo GS-GOGAT. El amonio es incorporado al glutamato por la acción de la GS originando glutamina. La GOGAT cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina al 2-

oxoglutarato produciéndose dos moléculas de glutamato (Lehmann y Ratajczak 2008). En el caso de las leguminosas amídicas en condiciones de fijación de nitrógeno utilizan los aminoácidos asparragina y glutamina como las moléculas de transporte del nitrógeno fijado desde las raíces a las otras partes de la planta (Lea *et al.* 2007).

Como consecuencia del catabolismo de las proteínas durante los procesos de movilización de nutrientes se libera gran cantidad de aminoácidos, que a su vez pueden actuar como materia prima para constituir nuevas proteínas o como sustratos para la respiración (Lehmann y Ratajczak 2008). La importancia del reciclaje de proteínas se deduce del elevado número de proteasas presentes en el genoma de plantas, así en *Arabidopsis* se han identificado 826 genes (van der Hoorn 2008). Nitrógeno reducido en forma de aminoácidos se ha observado en distintos procesos de movilización de nitrógeno tanto en fase vegetativa como reproductiva de la planta (Distelfeld *et al.* 2014). La mayoría de los aminoácidos sufren modificaciones antes de incorporarse al floema. Las enzimas del ciclo GS-GOGAT, la asparragina sintetasa y varias aminotransferasas llevarían a cabo estas reacciones de transferencia de nitrógeno, siendo relevantes en este proceso (Distelfeld *et al.* 2014).

3.2. Nucleótidos

Los nucleótidos son cruciales para el crecimiento, desarrollo y metabolismo de la planta (Zrenner *et al.* 2006). Los nucleótidos de purina y pirimidina son precursores esenciales de los ácidos nucleicos además de participar en múltiples procesos del metabolismo primario y secundario (Stasolla *et al.* 2003). Estos compuestos también son precursores directos de vitaminas de la clase B y coenzimas esenciales (NAD, FAD y SAM) (Zrenner *et al.* 2006). Los nucleótidos pueden ser sintetizados *de novo* a partir de aminoácidos y otras

pequeñas moléculas o a partir de nucleobases o nucleósidos procedentes de la ruta del reciclaje (Zrenner *et al.* 2006).

Los nucleótidos de pirimidina (CMP y UMP) se sintetizan *de novo* mediante la ruta del orotato, basada en la formación de UMP a partir de carbamilsulfato, aspartato y 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP). El UMP es fosforilado por una quinasa hasta UTP, a partir del cual se generan las demás pirimidinas (Stasolla *et al.* 2003). Por otro lado, el catabolismo de los nucleótidos de pirimidina consiste en la eliminación del 5'-fosfato en una reacción catalizada por la 5-nucleotidasa que libera nucleósidos. A continuación, las nucleosidasas actúan sobre éstos hidrolizando la unión entre la base pirimidínica y la pentosa ribosa (Zrenner *et al.* 2006).

Los nucleótidos de purina son sintetizados *de novo* a través de una ruta compleja que consta de diez reacciones enzimáticas secuenciales, que se llevan a cabo en el interior de los plastidios y mitocondrias (Zrenner *et al.* 2006). El primer paso de la ruta es la incorporación de la glutamina a PRPP originando 5-fosforibosil amina (PRA), catalizado por la fosforibosil-pirofosfato amidotransferasa (PRAT) y que es el paso clave en la regulación de la síntesis de purinas (Zrenner *et al.* 2006). Tras sucesivas reacciones origina IMP que es el primer producto con un anillo purínico completo (Smith y Atkins 2002). El IMP sintetizado es transformado en AMP que es transportado al citosol donde genera el resto de nucleótidos de purinas (XMP y GMP) (Zrenner *et al.* 2006). El catabolismo de nucleótidos de purinas también comienza con la eliminación del 5'fosfato de los nucleótidos por las nucleotidasas liberando nucleósidos (Cabello-Díaz *et al.* 2012) que, mediante reacciones de hidrólisis y desaminación, generarían xantina (Zrenner *et al.* 2006). Este compuesto es oxidado a ácido úrico por la xantina deshidrogenasa (XDH) (Triplett *et al.* 1982). A continuación, la uricasa o urato oxidasa (UO), localizada en el

peroxisoma, cataliza la oxidación del ácido úrico a 5-hidroxiisourato (HIU), con la reducción de oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno. Finalmente la oxidación del HIU origina alantoína.

3.3. Ureidos

Los ureidos (alantoína y alantoato) proceden de la oxidación de las purinas las cuales pueden ser sintetizadas *de novo* en el interior de los nódulos de las raíces de las leguminosas gracias a la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de N₂ (Atkins y Smith 2000). En base a sus propiedades, estos compuestos resultan moléculas idóneas para el transporte y almacenamiento de nitrógeno (Schubert y Boland 1990). Los ureidos se caracterizan por ser relativamente solubles en sistemas acuosos y poseer una baja reactividad química, por lo que son relativamente estables. Además, por su elevada relación N:C constituyen una forma concentrada de nitrógeno orgánico, lo que supone una eficaz economía de carbono para la planta. En los últimos años, además, se les ha conferido un papel protector como moléculas antioxidantes ante diversas situaciones de estrés para la planta (Brychkova *et al.* 2008; Nakagawa *et al.* 2011). El primer paso en la degradación de estos compuestos está catalizado por la alantoinasa que transforma alantoína en alantoato (Todd *et al.* 2006; Raso *et al.* 2007b). El alantoato puede degradarse por la enzima alantoicasa o alantoato amidinohidrolasa produciendo urea (Todd y Polacco 2006; Raso *et al.* 2007a), o bien mediante la alantoato amidohidrolasa liberando CO₂ y NH₄⁺ y ureidoglicina (Díaz-Leal *et al.* 2014). La ureidoglicina, que es un compuesto muy inestable, se transforma en ureidoglicolato. El ureidoglicolato también puede degradarse a glioxilato y urea por una uriedoglicolato urea liasa (Muñoz *et al.* 2006; Todd *et al.* 2006) o a glioxilato, amonio y CO₂ por una amidohidrolasa (Werner *et al.* 2008; Werner y Witte 2011).

4. Procesos fisiológicos con importante movilización de reservas y reciclaje de nutrientes

4.1. La germinación en leguminosas

La semilla ocupa una posición central en el ciclo de vida de las plantas y su aparición, junto con el desarrollo de la flor, fue uno de los principales avances en la evolución de las angiospermas. La semilla está estructural y físicamente equipada para garantizar su dispersión y la viabilidad del embrión que alberga en su interior. El almacenamiento de sustancias de reserva en la semilla garantiza la disponibilidad de nutrientes para el embrión tras la germinación (Nonogaki *et al.* 2010). El embrión originará una plántula que desarrollará un metabolismo autótrofo originando un organismo independiente garantizando así la supervivencia de la siguiente generación.

La germinación se define como el conjunto de eventos que ocurren desde la toma de agua por la semilla hasta la emergencia de la radícula a través de la envoltura seminal (Bewley 1997). La regulación de la germinación se basa en la acción de dos hormonas antagonistas, el ácido abscísico y las giberelinas, que inhiben o inducen la germinación, respectivamente (Seo *et al.* 2009). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados en este campo aún no se ha conseguido determinar con exactitud qué desencadena el inicio de la germinación (Rewers y Sliwinska 2014). Algunas semillas no completan la germinación a pesar de estar intactas, ser el embrión totalmente viable y encontrarse ante las condiciones favorables. Esto se debe a que se encuentran bajo el estado de dormición que, aunque no ocurre en todas las especies, se trata de una adaptación que optimiza y garantiza la distribución y evita la germinación de la semilla mientras se encuentra en la planta (Bewley 1997).

El proceso de germinación y desarrollo postgerminativo temprano engloba multitud de eventos celulares y moleculares que comienza con la toma de agua

por parte de la semilla o imbibición que se divide en tres fases en la mayoría de las especies (Figura 1) (Nonogaki *et al.* 2010).

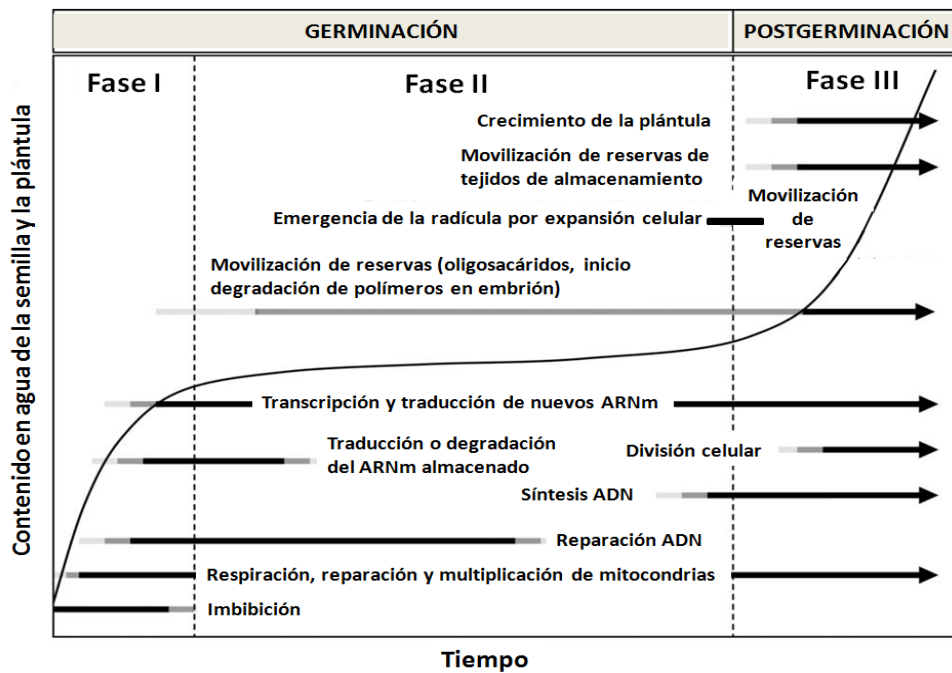


Figura 1. Esquema de las fases de la germinación y desarrollo postgerminativo temprano. Se muestran los diversos acontecimientos físicos y metabólicos que tienen lugar durante la germinación y desarrollo postgerminativo. El rango de tiempo varía entre horas y semanas dependiendo de la especie y las condiciones de germinación. En la figura se representa la curva de absorción de agua. (Adaptado de Nonogaki *et al.*, 2010).

La Fase I se caracteriza por una rápida entrada de agua hasta que se produce la hidratación de las matrices, paredes celulares y polímeros acumulados en las células. Esto conlleva alteraciones temporales en las estructuras celulares, especialmente en las membranas, debido al intercambio de los fosfolípidos de las membranas desde el estado de gel alcanzado durante la maduración y desecación, a nuevas membranas en un estado normal hidratado (Crowe *et al.* 1989). Este acontecimiento provoca una rápida pérdida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular al medio exterior (Bewley 1997; Nonogaki *et al.* 2010), acompañado de graves daños en orgánulos como las mitocondrias que reducen drásticamente su número. La semilla cuenta con la maquinaria

necesaria para reparar los daños sufridos en las proteínas y el ADN durante el proceso de deshidratación de la semilla (Nonogaki *et al.* 2010). Con la entrada de agua también se reanuda de forma gradual la actividad metabólica y se activa el metabolismo respiratorio. La semilla seca contenía mitocondrias con membranas internas poco diferenciadas y las suficientes enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas para proporcionar la cantidad necesaria de ATP a las pocas horas de la imbibición (Nonogaki *et al.* 2010). Estas enzimas se encontraban almacenadas en la semilla seca y posiblemente protegidas por la acción de las proteínas LEA (Grelet *et al.* 2005; Tolleter *et al.* 2007). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por la activación del metabolismo se retiran del medio por la acción de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa, la ascorbato peroxidasa o dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa (Wojtyla *et al.* 2006).

La toma de agua se mantiene constante en la Fase II, se produce un incremento el metabolismo energético y las mitocondrias sufren reparación o reemplazo por otras nuevas. Las semillas que se encuentran en dormición o están muertas no completan la germinación y permanecen en este estado (Nonogaki *et al.* 2010). Por último, y para completar la germinación, es necesario un nuevo incremento en la toma de agua determinando el comienzo de la Fase III (Nonogaki *et al.* 2010).

Durante las Fases I y II se produce una considerable actividad transcripcional necesaria para que la germinación se complete, de tal forma que la germinación viene regulada por la eliminación selectiva de determinados transcritos y la síntesis *de novo* de otros (Nonogaki *et al.* 2010). Las semillas almacenan todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas. Durante los momentos iniciales de hidratación, los ribosomas constituyen polisomas y utilizando ARNm almacenados en la semilla comienzan a

sintetizar nuevas proteínas necesarias para reanudar el metabolismo (Rajjou *et al.* 2004). En semillas de *Arabidopsis* (Nakabayashi *et al.* 2005), trigo (Sreenivasulu *et al.* 2008) o arroz (Howell *et al.* 2009) se ha encontrado una gran cantidad de ARNm que quedaron almacenados desde la formación de la semilla resistiendo a la desecación. La mayoría de estos ARN codifican proteínas relacionadas con la respuesta a ácido abscísico y contiene un motivo central ACGT en sus regiones promotoras (Nakabayashi *et al.* 2005). Otros ARNm codifican proteínas importantes en la maduración y desecación de la semilla como las LEA, que se degradan rápidamente tras la imbibición (Jiang y Kermodé 1994; Khan *et al.* 1997). A medida que la germinación progresa, son reemplazados y la síntesis de proteínas se hace más dependiente de nuevos transcritos (Bewley 1997). La degradación del ARN almacenado podría constituir una fuente de material para la síntesis de nuevos ácidos nucleicos en los ejes en desarrollo. De hecho se ha descrito un significativo incremento en la actividad de ribonucleasas en semillas tras la germinación en *Ricinus communis* (Winchcombe y Bewley 1992) y *Arabidopsis* (Li *et al.* 2006). Por otro lado, se ha descrito que *Phaseolus vulgaris* es una especie polisomática (Rewers y Sliwinska 2012). Es decir, se puede encontrar en un mismo órgano, como en semilla seca, células con diferente número de copias de ADN cromosómico como resultado de procesos de endorreducción. El ADN sufre replicación sin producirse una mitosis completa (endociclo) y por tanto no se reparte el ADN en dos nuevas células (Rewers y Sliwinska 2012). Muchos organismos emplean la endorreducción como parte final del proceso de diferenciación de sus semillas para acumular gran cantidad de ADN necesario para hacer frente a la gran síntesis de proteínas y al incremento en la actividad metabólica necesarios durante los primeros momentos de la germinación (Lee *et al.* 2009). Algunos autores sugieren que la poliploidía en el endospermo puede resultar una estrategia para almacenar nucleótidos para ser usados rápidamente al inicio de la germinación (Leiva-Neto *et al.* 2004).

Los cotiledones de *Phaseolus vulgaris* sufren una intensa endorreduplicación, ya que en los cotiledones de semillas secas se encuentra un 37 % de los núcleos endopoliploides, llegando a detectarse que el 0,5% de los núcleos contienen 128C. En ejes, sin embargo, se detecta endorreduplicación pero a un nivel mucho menor (Rewers y Sliwinska 2014).

La emergencia de la radícula establece el final de la germinación y el comienzo del crecimiento postgerminativo de la plántula. Esta expansión se debe a un aumento en la turgencia de las células que provoca el aumento de su tamaño. Estos procesos se producen gracias al reblandecimiento de las paredes celulares como consecuencia de la entrada de agua en la Fase III y por la acción de diferentes enzimas (Nonogaki *et al.* 2010). Se ha propuesto que en semillas de *Arabidopsis* y de *Medicago truncatula* el crecimiento de la radícula se produce por expansión celular y no por división, como se demuestra por la germinación en presencia de un inhibidor de la mitosis en el medio de imbibición (Gimeno-Gilles *et al.* 2009). En semillas de *Arabidopsis* la región inicial de elongación no se localiza en la radícula sino en una pequeña región adyacente y de transición con el hipocotilo. En esta zona el aumento en el tamaño de la célula se relaciona con procesos de endorreduplicación, duplicándose el material genético sin originar dos células por mitosis (Sliwinska *et al.* 2009).

Las semillas de distintas especies almacenan diferentes tipos de sustancias de reserva, proteínas, hidratos de carbono o lípidos (Buckeridge *et al.* 2004). De estas sustancias dependerá el crecimiento y desarrollo postgerminativo del eje tras la germinación (Bewley 1997). El embrión demanda gran cantidad de N, P y C, siendo la demanda de éste último la más estudiada (Stasolla *et al.* 2003). Las globulinas son las principales proteínas de reserva en dicotiledóneas (Tiedemann *et al.* 2000). Las proteínas de reserva se degradan en el interior de los cuerpos proteicos por la acción de proteasas que pueden ser sintetizadas *de*

novo o encontrarse almacenadas en la semillas protegidas de la proteólisis por dos mecanismos (Tiedemann *et al.* 2000). En el primero, las proteínas de reserva se acumulan durante la maduración de la semilla en el interior de compartimentos delimitados por membrana, como vacuolas de almacenamiento de proteínas o cuerpos proteicos. En el segundo, las proteínas serían resistentes a la proteólisis debido a la agregación y al nivel de empaquetamiento que adoptan al almacenarse (Shutov *et al.* 2003; Santos *et al.* 2012). Durante la germinación estas proteínas se degradan independientemente, detectándose al tercer día de imbibición un descenso del 50% de la albúmina frente a la globulina, que lo hace a los 6 días (Karmous *et al.* 2011). El patrón en la degradación de las reservas es diferente en cada especie. El catabolismo de las proteínas de reserva de los cotiledones libera gran cantidad de aminoácidos que se exportan al eje para utilizarse en su crecimiento postgerminativo (Herrera-Rodriguez *et al.* 2006) o como sustratos para la respiración (Lehmann y Ratajczak 2008). De forma generalizada la movilización de las proteínas de reserva comienza en el eje y a su término comienzan a hacerlo las de cotiledones (Tiedemann *et al.* 2000). La falta de aminoácidos para sintetizar nuevas proteínas en el eje parece ser la señal que desencadena la movilización de reservas en cotiledones (Tiedemann *et al.* 2000). También se ha sugerido una conexión entre las proteínas de almacenamiento y la movilización de los hidratos de carbono en las semillas de *Sesbania virgata*, lo que aseguraría un flujo equilibrado del carbono y nitrógeno para el desarrollo de la plántula (Tonini *et al.* 2010). En este sentido, la expresión de muchos genes que codifican enzimas proteolíticas así como su actividad estaría regulada negativamente por nivel de azúcar (Borek y Ratajczak 2002). En las semillas también existe como material de reserva polisacáridos cuya hidrólisis libera azúcares proporcionando energía así como esqueletos carbonados (Santos y Buckeridge 2004; Tonini *et al.* 2010).

El nivel de aminoácidos libres en semillas secas de judía es de 63 μ moles/unidad (Quiles *et al.* 2009). Durante la germinación este nivel disminuye levemente para volver aumentar con la emergencia de la radícula como consecuencia de la movilización proteínas de reserva (Quiles *et al.* 2009). En semillas secas de judía se ha encontrado ureidos a una concentración de 0,1% (p/p) procedentes de su acumulación durante la fase de llenado de la semilla. La concentración de ureidos aumenta tras la emergencia radicular tanto en ejes como en cotiledones (Quiles *et al.* 2009). Estos ureidos se sintetizan por la oxidación de purinas que podrían proceder del reciclaje o del catabolismo de ácidos nucleicos, ya que en los primeros momentos de la germinación la síntesis de novo resultaría insuficiente. Esta hipótesis está apoyada por la identificación y purificación de una fosfatasa con alta afinidad por nucleótidos en ejes de judía cuya actividad incrementa tras la emergencia de la radícula coincidiendo con el aumento en el nivel de ureidos (Cabello-Díaz *et al.* 2012). Los nucleótidos necesarios para el desarrollo del eje durante la germinación proceden de la vía del reciclaje debido a que la maquinaria enzimática responsable de la producción de purinas no está disponible durante las primeras etapas de la germinación y los nucleótidos de pirimidina se sintetizan a muy baja velocidad (Mohlmann *et al.* 2010). El catabolismo de los ácidos nucleicos podría liberar nucleósidos y nucleobases con los que se sintetizarían a su vez nucleótidos por acción de quinasas y fosforribosil-transferasas (Mohlmann *et al.* 2010). Por tanto, durante la germinación debe existir una estricta regulación entre las rutas de síntesis, reciclaje y degradación de nucleótidos.

4.2. La senescencia en las hojas

La senescencia de la hoja es un proceso muy complejo y altamente regulado que acontece al final de su desarrollo y que termina con su degradación (Woo *et al.* 2013). Durante este proceso se producen secuencialmente una serie de cambios en la fisiología, bioquímica y en la expresión génica de sus células. La

consecuencia de estos cambios es la muerte celular, que está considerada un tipo de muerte celular programada (MCP) (López-Fernández *et al.* 2015). La MCP durante la senescencia de hojas, a diferencia de lo que ocurre en otros procesos, se produce lentamente y de forma secuencial. Esta comienza generalmente por las células del mesófilo de los márgenes y punta de la hoja y progresa hasta la base (Lim *et al.* 2007). Este hecho, junto con el mantenimiento del buen estado del sistema vascular hasta la fase final de la senescencia, permite una eficiente movilización de los nutrientes originados por la degradación de macromoléculas durante la MCP. Esto es crucial para el desarrollo y supervivencia de la planta ya que estos nutrientes son dirigidos vía floema hasta tejidos en desarrollo o son destinados al llenado de la semilla (Fukuda 1996; Cholewa y Griffith 2004).

La senescencia foliar está regulada por la edad de la planta y por señales endógenas o externas, cuyos mecanismos de señalización están altamente coordinados (Sarwat *et al.* 2013). De modo que este proceso puede ocurrir prematuramente en hojas jóvenes si la planta se desarrolla en condiciones ambientales desfavorables (Lim *et al.* 2007). El desarrollo fisiológico de la planta, así como su edad o la acción de las fitohormonas intervienen en la producción de las señales endógenas (Sarwat *et al.* 2013). Respecto a las señales externas hay que diferenciar entre factores medioambientales abióticos y bióticos. Los factores abióticos más importantes son la sequía, la limitación de nutrientes, las temperaturas extremas, el estrés oxidativo, la irradiación por UV-B y el ozono. En las plantas perennes la senescencia foliar resulta una estrategia muy efectiva cuando bajo condiciones desfavorables se reduce la actividad fotosintética y resulta más rentable la pérdida de este órgano (Lim *et al.* 2007). Entre los factores bióticos destacan la infección por patógenos y la competencia por la luz (Lim *et al.* 2007; Sakamoto y Takami 2014). La alta concentración de carbohidratos y una alta accesibilidad de carbono frente a una

baja de nitrógeno en la hoja también regula el inicio de la senescencia (Wingler *et al.* 2006).

El acontecimiento más temprano que se produce durante la MCP de la hoja es la degradación de los cloroplastos, mientras que la mitocondria y el núcleo permanecen intactos hasta la fase final del proceso para garantizar la producción de energía y la expresión de genes (Lim *et al.* 2007). Con la desintegración de los cloroplastos se interrumpe la actividad fotosintética de la hoja reduciéndose el anabolismo y liberándose el 70% del nitrógeno contenido en la hoja, que se encuentra formando parte principalmente de la rubisco. Este proceso comienza con la pérdida de la integridad de la membrana del tilacoide, que desestabiliza la estructura de la grana y finalmente originan unas estructuras llamadas plastoglobulos (Hörtensteiner y Feller 2002). La clorofila y las proteínas que componían el cloroplasto se dirigen al interior de las vacuolas probablemente para evitar la fototoxicidad en la célula por la acumulación los pigmentos, orgánulo donde se produce la hidrólisis completa por la acción de endo y exopeptidasas (Christ *et al.* 2012). Los aminoácidos derivados del catabolismo de las proteínas mediante reacciones de transaminación pueden producir glutamato que por acción de la GDH libera oxoglutarato y amonio. Este amonio es retirado por la acción de la GS y produce glutamina (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010). Durante la senescencia se ha detectado un incremento en la expresión de dos genes que codifican la glutamina sintetasa y la glutamato deshidrogenasa (Terce-Laforgue *et al.* 2004), por lo que son utilizados como marcadores de la senescencia foliar (Pageau *et al.* 2006). También se ha observado aumento en la expresión de permeasas de aminoácidos involucradas en el paso de estos aminoácidos al floema durante la senescencia de hojas de *Brasica* y *Arabidopsis* (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010). Además, se ha propuesto el papel de pequeños péptidos como transportadores de nitrógeno en *Arabidopsis* (van der Graaff *et al.* 2006).

La degradación de los lípidos de membrana produce ácidos grasos que pueden oxidarse para producir energía o transformarse en α -cetoglutarato por el ciclo del glioxilato. Éste α -cetoglutarato a su vez, puede convertirse en azúcares mediante la glucogénesis, o bien, ser usado para movilizar los aminoácidos liberados tras la hidrólisis de las proteínas (Lim *et al.* 2007; Sakamoto y Takami 2014). Como consecuencia de la oxidación de los lípidos se produce un incremento en la concentración de ROS lo que activa la expresión de diferentes genes que participan en la regulación de este proceso (Dai *et al.* 1999). Una vez que se degrada la rubisco y se produce el catabolismo de las proteínas y lípidos de membrana la senescencia es irreversible, considerándose el nivel de proteína y la cantidad de clorofila como los principales marcadores de la senescencia foliar (Sato *et al.* 2007).

Otros cambios celulares característicos de la senescencia en la hoja son una reducción masiva en la concentración de ácidos nucleicos (Lim *et al.* 2007). Los niveles de ARN descienden rápidamente, distinguiéndose inicialmente una degradación del ARNr del cloroplasto y ARNr citoplasmático, seguida por la del ARNm y ARNt citoplasmático. La disminución en el nivel de ARN está acompañado por el incremento en la actividad de las ribonucleasas (Lim *et al.* 2007). Por último, en la fase más tardía de la senescencia se produce un colapso controlado de la vacuola y se degrada el núcleo. Es característico en células que sufren MCP la condensación de la cromatina nuclear por la hidrólisis endonucleolítica del ADN nuclear provocando una estructura en forma de escalones (“laddering”) del ADN (Domínguez y Cejudo 2012). Se ha sugerido que la degradación de los ácidos nucleicos del núcleo o de los orgánulos durante la MCP libera gran cantidad de nucleótidos, bases de purinas y pirimidinas y fosfato que pueden ser movilizados. Este proceso, a diferencia del de otras macromoléculas, aún es poco conocido (Sakamoto y Takami 2014).

El diseño de mutantes ha permitido ciertos avances en el conocimiento del mecanismo por el que se desencadena y produce la senescencia. La MCP durante la senescencia está estrictamente controlada por un complejo programa genético. En *Arabidopsis* se han identificado más de 800 genes asociados a la senescencia, los genes SAGs y los SEN (Buchanan-Wollaston *et al.* 2005). La mayoría de ellos codifican enzimas hidrolíticas que degradan macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos, lo que conlleva la dramática alteración en fisiología celular que subyace a la senescencia foliar (Gepstein *et al.* 2003; Lin y Wu 2004; Soudry *et al.* 2005; Guo y Gan 2006; van der Graaff *et al.* 2006). Se han descrito dos familias de factores de transcripción, NAC y WRKY, que participan regulando la expresión de dichos genes y que son la clave del mecanismo que controla el proceso en *Arabidopsis*. Estos factores de transcripción se asocian con diferentes tipos de MCP desencadenada bajo distintos tipos de estrés (Woo *et al.* 2013).

La regulación hormonal juega un papel determinante en la senescencia foliar, involucrando a una compleja red de mecanismos de señalización que participan en sus diferentes fases (Sarwat *et al.* 2013). Las citoquininas retrasan la senescencia y durante ésta sus niveles descienden gradualmente (Kollmer *et al.* 2011). Se desconoce con exactitud el mecanismo de acción, pero se ha relacionado con la acción de una invertasa extracelular, que cuando se inhibe se retrasa el descenso de citoquininas y el inicio de la senescencia (Lara *et al.* 2004). El etileno por el contrario la promueve, y en plantas transgénicas con la síntesis de etileno bloqueada se retrasa la senescencia (Yang *et al.* 2008; Xu *et al.* 2011). Por otro lado, se ha observado que el ácido abscísico (ABA), una hormona que media las respuestas de las plantas al estrés ambiental, aumenta su nivel en hojas senescentes y provoca la inducción de diversos genes SAGs además de promover la abscisión de la hoja senescente (Choi y Hwang 2011). En plantas de *Arabidopsis* con el receptor del ABA RPK1 no funcional se

observa un retraso en el inicio de la senescencia natural, mientras que la sobreexpresión de dicho receptor la acelera (Lee *et al.* 2011). El metiljasmonato (MeJA) y el ácido jasmónico promueven la senescencia. La aplicación exógena de MeJa induce la expresión de genes SAGs y produce la caída de la actividad fotosintética al promover la degradación de la clorofila (Shan *et al.* 2011). El ácido salicílico (SA) aumenta su concentración en hojas senescentes y está relacionada con la inducción de genes SAGs (Lim *et al.* 2007). Los brassinosteroides (BRs) promueven la senescencia, como sugirieron los trabajos con mutantes deficientes en su receptor en los que se retrasó la senescencia (Lim *et al.* 2007). El nivel de auxina en la hoja senescente incrementa y existen evidencias de que promueve el avance de la senescencia (Lim *et al.* 2010). Las giberelinas retrasan la senescencia como han sugerido el trabajo en *Paris polyphylla*, en el que la aplicación endógena de esta hormona impide la degradación de la clorofila (Li *et al.* 2010).

4.3. Floración, formación y maduración de frutos

Las flores son unas estructuras esenciales para la reproducción de las plantas. El estudio del desarrollo floral ha permitido establecer los mecanismos complejos implicados en la señalización hormonal así como cambios en la expresión génica (Vaddepalli *et al.* 2015). Durante la fase reproductiva de la planta, el meristemo apical produce un meristemo floral a partir del cual se origina los distintos órganos de la flor. A pesar de los avances recientes, el conocimiento sobre el desarrollo floral es aún bastante limitado. La estructura central de la flor es el ginoceo, donde se encuentra el ovario con los óvulos (Seymour *et al.* 2013). La fertilización del óvulo desencadena la transformación del ginoceo en un fruto en desarrollo, en un proceso con alto control hormonal y donde el crecimiento y maduración del ovario está altamente coordinado con el desarrollo de la semilla.

Los frutos de las angiospermas permiten el desarrollo óptimo del óvulo y de la semilla dentro de una estructura protectora. A la vez que proporciona unos mecanismos adecuados de dispersión. En general, los frutos se pueden agrupar en secos y carnosos, dependiendo de la estrategia de dispersión. Mientras que los primeros tienen una estrategia pasiva, los segundos han desarrollado asociaciones con animales que usan como métodos de dispersión y, por tanto, sufren modificaciones para atraer a estos vectores de propagación (Gómez *et al.* 2014). El conocimiento molecular y bioquímico del desarrollo del fruto se ha realizado en dos organismos modelos, *Arabidopsis* como fruto tipo seco y tomate como fruto carnoso, reuniéndose en varias revisiones recientes los principales avances (Ruan *et al.* 2012; Seymour *et al.* 2013; Gómez *et al.* 2014). El desarrollo y senescencia de los frutos secos es un proceso en principio bastante simple, el fruto crece tras la fertilización con poca diferenciación hasta que alcanza su tamaño final y entonces entra en senescencia que acaba con el proceso de abscisión. En cambio, en los frutos carnosos el proceso de desarrollo es más complejo y tras la fase de crecimiento se distinguen también fases de maduración y sobre-maduración (Gómez *et al.* 2014).

En el desarrollo del fruto de *Arabidopsis* se ha observado procesos de muerte celular durante la fase temprana de desarrollo en el tubo de transmisión del polen, en el estigma y en los óvulos no fertilizados (Farage-Barhom *et al.* 2008; Carbonell-Bejerano *et al.* 2010). Durante esta fase inicial el fruto crece rápidamente tras la fertilización y este crecimiento es el resultado de una rápida división celular así como de expansión celular, proceso controlado fundamentalmente por auxinas y giberilinas (Gómez *et al.* 2014). El fruto dispone de células mesofilicas así como de estomas. En la fase final del desarrollo, las valvas entran en programa de senescencia y los componentes van a ser movilizados para facilitar el reciclaje. El marcador general de

senescencia, la clorofila, alcanza un máximo durante la formación de fruto para descender coincidiendo con la senescencia (Carbonell-Bejerano *et al.* 2010; Kou *et al.* 2012). Aunque se desconoce el mecanismo molecular que desencadena la senescencia, en frutos de *Arabidopsis* se ha implicado a las giberelinas (Dorcey *et al.* 2009) así como a factores de transcripción (Kou *et al.* 2012). Se ha realizado un estudio transcriptómico de genes asociados al desarrollo y senescencia de frutos de *Arabidopsis* (Wagstaff *et al.* 2009). Gómez y col (2014) han comparado el estudio transcriptómico de *Arabidopsis* (Wagstaff *et al.* 2009) con otro de maduración de tomate (Zhang *et al.* 2013) y han encontrado similitudes que sugieren analogía entre el programa de senescencia en ambos tipos de frutos.

5. Papel biológico de las nucleasas

Las nucleasas juegan un importante papel en el mantenimiento de la integridad del ADN participando en procesos de recombinación, reparación y replicación (Mason y Cox 2012). Además, participan en la degradación de los ácidos nucleicos que acontece durante el proceso de MCP (Sakamoto y Takami 2014). Las nucleasas están distribuidas ampliamente por todos los seres vivos, habiéndose aislado a partir de hongos, bacterias, plantas y animales. La mayoría de las nucleasas actúan intracelularmente, aunque se han descrito algunas enzimas de hongos que lo hacen extracelularmente, como la S1 de *Aspergillus oryzae* (Uozumi *et al.* 1969) o P1 de *Penicillium citrinum* (Kuninaka *et al.* 1961).

El estudio del catabolismo del ADN comenzó a principios del siglo XX (Araki 1903) denominándose “nucleasas” a aquellas enzimas que llevaban a cabo la hidrólisis del enlace fosfodiéster entre los nucleótidos. Las nucleasas pueden degradar ADN de cadena simple (ADNmc) o ADN de doble cadena (ADNbc). Algunas incluso son capaces de reconocer e hidrolizar zonas de cadena simple

en hebras de ADNbc que se originan como consecuencia de un error en el apareamiento de nucleótidos (Shishido y Ando 1985). También pueden degradar ARN, denominándose ribonucleasas si es su sustrato específico (Lesniewicz *et al.* 2013).

5.1. Clasificación de las nucleasas que participan en procesos de muerte celular en plantas.

El papel biológico de las nucleasas está asociado con la degradación de ácidos nucleicos que acontece durante la MCP. Para la planta la MCP es necesaria para el correcto mantenimiento de la homeostasis celular y el desarrollo. En base a su mecanismo de acción, estas enzimas se clasifican en dos grandes grupos, las endonucleasas y las exonucleasas, aunque también existen las exo-endo nucleasas que pueden actuar indistintamente según los dos modos (Sakamoto y Takami 2014).

5.1.1. Endonucleasas

Son las enzimas que actúan sobre el enlace fosfodiéster de la cadena de ácidos nucleicos con independencia de que exista un extremo en la cadena, liberando en la reacción oligonucleótidos o mononucleótidos. Dentro de este grupo se encuentran las familias de nucleasas tipo S1 y las del tipo estafilococos (SNasa) (Sakamoto y Takami 2014).

5.1.1.1. Endonucleasas tipo S1

Las nucleasas tipo S1 se caracterizan por tener una gran similitud en la secuencia de su centro catalítico con el descrito en otras nucleasas de hongos como la S1 de *Aspergillus oryzae* y P1 de *Penicilium citrimun* (Lesniewicz *et al.* 2013). En todas estas nucleasas se conserva el dominio PF02265. Dentro de este grupo se encuentra la familia S1/P1 (Sakamoto y Takami 2014). La mayoría de las secuencias aminoacídicas de las nucleasas identificadas son

ortólogas a P1 y comparten características catalíticas. Estas enzimas son conocidas como las nucleasas Zn^{2+} -dependientes y se caracterizan por poseer un pH óptimo ácido y por el requerimiento de zinc, necesario para la estabilización de estas enzimas y para su reactivación tras tratamientos con EDTA. Sin embargo, no siempre se requiere de la presencia de Zn^{2+} para la determinación de la actividad enzimática. Tienen la capacidad de degradar ARN y ADN de cadena simple con preferencia de este último. Son glicoproteínas monoméricas con una masa molecular comprendida entre 30 y 45 kDa. Estas nucleasas son denominadas frecuentemente como nucleasas tipo I (EC 3.1.30.1) por compartir las características de este grupo. No obstante, estudios recientes ha sugerido que no todas las nucleasas S1 presentan los mismos requerimientos de pH o ión (Lesniewicz *et al.* 2013). En *Arabidopsis* se ha identificado una familia de nucleasas tipo S1, que está compuesta por cinco miembros a los que se les ha denominado *ENDO* (Triques *et al.* 2007). La nucleasa codificada por *ENDO1* fue descrita inicialmente como BFN1 tras aislarse de hojas senescentes de *Arabidopsis* (Pérez-Amador *et al.* 2000). BFN1 degrada ADNmc y ARN como sustrato, con preferencia a ADNbc, con un pH óptimo neutro y requiere de Zn^{2+} como cofactor. El análisis de la expresión de su promotor ha sugerido que esta nucleasa se expresa en diferentes tejidos donde se produce MCP, como la zona de abscisión de la hoja y flores o durante la formación de vasos, además de en hojas senescentes (Farage-Barhom *et al.* 2008). La endonucleasa ENDO2 se caracteriza por degradar preferentemente ADNmc con un pH óptimo neutro, aunque puede hidrolizar ADNmc a pH ácido en presencia de Ca^{2+} y Zn^{2+} (Ko *et al.* 2012). Por otro lado, ENDO3 es la única enzima de esta familia cuyas características se asemejan a la nucleasa S1, se trata de una enzima Zn^{2+} -dependiente que degrada ADNmc a pH ácido. La enzima ENDO4 se caracteriza por hidrolizar ADNmc a pH neutro y en presencia de Ca^{2+} y Mn^{2+} . Respecto a la ENDO5 no se detectó actividad en ninguna de las diferentes condiciones de ensayo. Otras

nucleasas tipo S1 se han identificado. ZEN1 fue purificada a partir de cultivos celulares de *Zinia* durante el proceso de muerte celular y formación de los elementos traqueales (Thelen y Northcote 1989) y es una glicoproteína de 42 kDa, dependiente de Zn^{2+} y que hidroliza ADNbc, ADNmc y ARN (Aoyagi *et al.* 1998; Ito y Fukuda 2002). Otras dos nucleasas, ZEN2 y ZEN3, de *Zinia* pertenecientes a la misma familia muestran inducción en su expresión en hojas senescentes (Pérez-Amador *et al.* 2000). La nucleasa CEL1 de *Celery* tiene una alta capacidad para actuar sobre nucleótidos desapareados como consecuencia de una mutación en el ADN. Esta enzima es una glicoproteína que requiere para su actividad la presencia de Mg^{2+} o Zn^{2+} y un pH óptimo neutro (Yang *et al.* 2000). Por su mecanismo de acción esta nucleasa es comúnmente usada en el análisis TILLING (Triques *et al.* 2007).

5.1.1.2. Endonucleasas tipo SNasa

Las nucleasas SNasa se caracterizan por conservar el dominio PF00565. Estas nucleasas se caracterizan por ser Ca^{2+} -dependientes (CAN), poseer un pH óptimo neutro y por la inhibición de su actividad por Zn^{2+} . La mayoría de estas enzimas hidrolizan ADN de cadena simple (ADNmc) con preferencia a ARN (Sugiyama *et al.* 2000; Sakamoto y Takami 2014). En *Arabidopsis* se han identificado dos SNasas, AtCAN1 y AtCAN2 cuya expresión se induce durante la senescencia de la hoja (Isono *et al.* 2000; Guo *et al.* 2012; Lesniewicz *et al.* 2012). Se postula que estas nucleasas estarían localizadas en la membrana plasmática (Lesniewicz *et al.* 2012). En *Cucumis sativus* se ha identificado una CsCAN cuya expresión se induce en flores femeninas por la acción del etileno (Gu *et al.* 2011). En *Eucommia ulmoides*, EuCAN1 y EuCAN2, participan en la formación de los secundarios del xilema (Chen *et al.* 2012).

5.2. Exonucleasas

La actividad de las exonucleasas ha sido implicada en procesos de replicación y reparación del ADN (Mason y Cox 2012). Estas enzimas únicamente pueden actuar sobre cadenas de ácidos nucleicos abiertas, actuando sobre el extremo 5', 3' o ambos. Liberan mononucleótidos monofosfato para corregir bases mal apareadas (Mason y Cox 2012). Sólo unas pocas exonucleasas han sido caracterizadas en plantas. WEX es una exonucleasa de *Arabidopsis* que tiene un dominio exo similar al de la helicasa RecQ (familia 3'-5'-exonucleasa, dominio PF01612) que desempeña un papel en la reparación del ADN y que no se ha relacionado con senescencia. La deficiencia de esta proteína provoca enfermedades genéticas en humanos (Plchova *et al.* 2003; Li *et al.* 2005; Smith *et al.* 2013). Únicamente la proteína DPD1 de *Arabidopsis* se ha relacionado con el descenso en el ADN de los orgánulos (mitocondria y cloroplastos) que se produce durante la senescencia (Matsushima *et al.* 2011; Tang *et al.* 2012). DPD1 codifica una proteína que conserva tres dominios Exo (familia EXONucleasa/Ribonucleasa, dominio PF00929), los cuales muestran una alta similitud con una subunidad de la ADN polimerasa multimérica (pol III) de *E.coli*. La proteína DPD1 sobreexpresada y purificada a partir de *E.coli* muestra una actividad exonucleasa en presencia de Mg^{2+} (Matsushima *et al.* 2011). La acumulación de transcritos de DPD1 se observó en polen y en hojas senescentes de *Arabidopsis* (Tang y Sakamoto 2011). La nucleasa DPD1 únicamente se ha sido localizada en mitocondrias y cloroplastos (Sakamoto y Takami 2014).

6. Hipótesis y objetivos de la tesis

En esta Tesis se ha planteado que el catabolismo de los ácidos nucleicos que acontece durante la germinación, así como en diferentes procesos de muerte celular programada durante la senescencia, podría generar compuestos con los que sintetizar ureidos y de esta forma transportar nitrógeno a otras partes de la

planta donde se requiere. Por tanto, cabría esperar que en diferentes procesos en los que se produce muerte celular o existe una gran movilización de nutrientes, la actividad las actividades nucleasas y ribonucleasas deberían aumentar. Para determinar esta hipótesis de partida se han presentado los siguientes objetivos:

1. Analizar las actividades nucleasas y ribonucleasas en ejes y cotiledones de judía durante la germinación y desarrollo postgerminativo temprano.
2. Purificar e identificar la proteína con actividad mayoritaria determinada en plántulas de judía y cuya actividad pudiera estar implicada en la acumulación de ureidos.
3. Identificar el gen que codifica la nucleasa, así como posibles parálogos.
4. Analizar la actividad y la expresión de las nucleasas en plántulas de judía desarrolladas en diferentes condiciones.
5. Analizar la actividad y la expresión de las nucleasas durante procesos con alta movilización de nutrientes de judía como la senescencia de cotiledones y de hojas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

1.1. Productos químicos y enzimas comerciales

Los diferentes reactivos y enzimas que se utilizaron en este trabajo fueron suministrados por las casas comerciales que se indican entre paréntesis en cada caso. La conservación y manipulación de estos reactivos siempre se realizó siguiendo las indicaciones de los diversos fabricantes.

1.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados y suministrados por Invitrogen.

2. Material biológico y condiciones de cultivo

2.1. Material vegetal

En los experimentos realizados con plantas de judía, (*Phaseolus vulgaris* L.) se utilizaron semillas de la variedad Great Northern, suministradas por el Profesor A. De Ron (Misión biológica de Galicia, CSIC, Pontevedra). En los experimentos realizados con plantas de otras especies, las semillas se obtuvieron de Eurosemillas S.A y diferentes mercados locales.

2.1.1. Imbibición de semillas y desarrollo postgerminativo

De forma rutinaria el proceso de imbibición y esterilización de las semillas se llevó a cabo en el interior de la cámara de flujo laminar mediante un lavado con etanol absoluto durante 30 s, seguido de otro lavado con solución acuosa de NaClO al 0,2% (v/v) durante 5 min. A continuación, las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril, al menos seis veces, y se colocaron en placas de Petri de 120 mm de diámetro (nunca más de doce semillas) sobre tres discos de papel estéril, humedecidos con 8 ml de la solución acuosa que se indique y se cubrieron con un cuarto disco de papel humedecido con 4 ml de la misma solución. En los experimentos realizados con plántulas de judía, las semillas se

mantuvieron en el interior de las placas desde su imbibición hasta un máximo de 6 DDI. Estas placas se mantuvieron en el interior de una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 14 h de luz, a 26 °C y 10 h de oscuridad a 20 °C, con una humedad relativa constante del 70% y una intensidad lumínica de 200-300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La humedad en el interior de la placa se mantuvo gracias a la adición regular de solución, manteniendo siempre las condiciones de esterilidad.

2.1.2. Cultivo de plantas

En los experimentos en los que se analizó alguna parte de la judía de más de 6 días de desarrollo, las semillas se traspasaron al 3 DDI (día después de la imbibición) a macetas que contenían como sustrato perlita y vermiculita en relación 1/3, depositando hasta 5 semillas por maceta. Las plantas se mantuvieron en el interior de la cámara de cultivo hasta el momento de la recogida de muestras, en las condiciones indicadas anteriormente y se regaron cada tres días con medio de cultivo para plantas Harper y Gibson, diluido $\frac{1}{4}$ y enriquecido con KNO_3 10 mM como fuente de nitrógeno.

- Solución nutritiva Harper y Gibson: solución compuesta por 25 ml de solución de macronutrientes, 1 ml de solución de micronutrientes y agua destilada hasta un volumen final de 1 litro.
 - Solución de macronutrientes: KH_2PO_4 0,05 g/l, K_2SO_4 0,2 g/l, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, CaCl_2 0,05 g/l y sandofer (quelato de Fe) 0,2 g/l. La solución debe ajustarse a pH 6,5 con KOH.
 - Solución de micronutrientes: H_3BO_3 2,86 g/l, $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 2,08 g/l, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 g/l, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 g/l y $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g/l.

2.1.3. Experimentos fisiológicos

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron un mínimo de tres ocasiones. El diseño de cada experimento en concreto, así como el momento de recogida y tratamiento de muestras se describe a continuación.

2.1.3.1. Análisis de actividad nucleasa y expresión de genes en ejes y cotiledones de plántulas de judía a lo largo de la germinación y desarrollo postgerminativo

A partir de plántulas de judía germinadas en las condiciones estándar, se recogieron ejes y cotiledones en diferentes días a lo largo de la germinación y desarrollo postgerminativo, obteniéndose sus extractos crudos. En los extractos crudos se determinó la actividad nucleasa utilizando como sustrato ADN_{mc} o ARN. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo como se describen en el apartado 5.1. Los geles se cargaron normalizando por peso fresco (5 µl de extracto con una relación de tampón:peso fresco de 4:1) y por proteína soluble (10 µg). El ensayo se llevó a cabo con tampón Tris 50 mM (pH 6,5) y se incubaron a 50 °C durante 10 min las muestras de ejes y 60 min las de cotiledones. En estas muestras también se analizó la expresión de las diferentes nucleasas que componen la familia de nucleasas S1/P1 (apartado 15).

2.1.3.2. Análisis de la actividad nucleasa en ejes y cotiledones de plántulas de varias leguminosas

La actividad nucleasa se determinó en ejes y cotiledones de plántulas de 5 DDI de diferentes especies de leguminosas ureídicas y amídicas, germinadas y desarrolladas en condiciones estándar. Los geles se cargaron normalizando por proteína soluble (15 µg) y el ensayo se llevó a cabo con tampón Tris 50 mM (pH 6,5) y se incubó a 50 °C durante 20 min las muestras de ejes y 60 min las de cotiledones (apartado 5.1.1.). En estas muestras también se determinó el nivel de ureidos (apartado 4.3).

2.1.3.3. Análisis de actividad nucleasa y expresión de genes en distintas partes de plántulas de judía

Plántulas de judía de 6 DDI se dividieron en radícula, hipocotilo e epicotilo y se analizó la actividad nucleasa normalizando por proteína soluble (10 µg) y el desarrollo de la actividad se realizó en tampón acetato 50 mM (pH 5,5) e incubando a 50 °C durante 10 min. (apartado 5.1.1). En estas mismas muestras se analizó la expresión de los genes de la familia S1/P1 (apartado 15).

2.1.3.4. Efecto de la etiolización en ejes de judía

Tras la imbibición de las semillas, las placas de Petri se mantuvieron envueltas en papel de aluminio. Los ejes de estas plántulas etioladas se recogieron a los 4 y 6 DDI junto con los ejes de plántulas desarrolladas en condiciones estándar (control). En estas muestras se determinaron la concentración de proteína soluble (apartado 4.1) y de ureidos (apartado 4.3), así como la actividad nucleasa (apartado 5.1.1). El ensayo de la actividad se llevó a cabo normalizando por proteína soluble (10 µg), en tampón acetato 50 mM (pH 5,5) e incubando a 50 °C durante 10 min. En estas mismas muestras se analizó la expresión de los miembros nucleasa de la familia S1/P1 (apartado 15).

2.1.3.5. Tratamientos con fosfato, nitrato y alopurinol en ejes de judía

Las semillas esterilizadas se colocaron en el interior de placas de Petri en las que los discos de papel se humedecieron con una solución de Pi (NaHPO₄) 5 mM, nitrato 10 mM (KNO₃), alopurinol 1 mM o agua estéril (control). Los discos de papel se sustituyeron diariamente por otros nuevos y humedecidos con dichas soluciones. Los ejes se recogieron a los 4 DDI. El ensayo de la actividad se llevó a cabo normalizando por proteína soluble (10 µg), en tampón acetato 50 mM (pH 5,5) e incubando a 50 °C durante 10 min (apartado 5.1.1). En estas mismas muestras se analizó la concentración de proteína soluble

(apartado 4.1) y la concentración de ureidos (apartado 4.3), así como la expresión de los miembros nucleasa de la familia S1/P1 (apartado 15).

2.1.3.6. Efecto de las condiciones adversas en ejes de judía

En extractos crudos obtenidos de plántulas germinadas bajo diferentes condiciones se determinó la concentración de proteína soluble (apartado 4.1) y de ureidos totales (apartado 4.3), así como la actividad nucleasa (apartado 5.1.1). El ensayo de la actividad se llevó a cabo normalizando por proteína soluble (10 µg), en tampón acetato 50 mM (pH 5,5) e incubando a 50 °C durante 10 min (apartado 5.1.1). En estas mismas muestras se analizó la expresión de los miembros nucleasa de la familia S1/P1 (apartado 15).

- *Tratamientos con NaCl.* Las plántulas de judía germinaron y se desarrollaron en el interior de placas de Petri con diferentes concentraciones de NaCl (0, 50 y 100 mM). Los discos de papel humedecidos se sustituyeron diariamente y los ejes se recogieron a los 4 DDI.
- *Tratamientos con metil-jasmonato.* Plántulas de judía a los 6 DDI se trataron con una solución de metil-jasmonato 50 µM durante 24 h.
- *Tratamientos con especies reactivas de oxígeno.* Las plántulas de judía germinaron y se desarrollaron en el interior de placas de Petri que contenían discos de papel humedecidos con agua estéril (control) o con una solución de peróxido de hidrógeno 10 mM. Los discos de papel humedecidos se sustituyeron diariamente y los ejes se recogieron a los 4 DDI.

2.1.3.7. Análisis de la movilización de reservas en cotiledones de judía

El análisis de la movilización de las reservas de los cotiledones de plántulas de judía se llevó a cabo determinando la concentración de proteína soluble (apartado 4.1), de ureidos (apartado 4.3) y de la cantidad de globulinas

(apartado 4.4). La actividad nucleasa se llevó a cabo según se indica en el apartado 5.1, utilizando tampón TES 50 mM (pH 7) en ausencia y presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}), normalizando la actividad por cantidad de proteína soluble (10 μg) y desarrollándola tras incubar a 50 °C durante 90 min (apartado 5.1.1). La expresión de los genes de las nucleasas de la familia de nucleasas S1/P1 se analizó en todas las muestras (apartado 15).

- *Efecto del rejuvenecimiento de los cotiledones.* A plántulas sembradas en macetas a los 7 DDI se les eliminó el epicotilo con la ayuda de una cuchilla estéril a la altura de la inserción de los cotiledones y, las plántulas se mantuvieron en la cámara de cultivo hasta los 11 DDI. El análisis de estos cotiledones se realizó junto a otros recogidos a los 7 y 11 DDI a partir de plántulas desarrolladas en condiciones estándar (control).
- *Efecto la deficiencia de nutrientes.* Las plántulas se regaron desde el momento de su siembra con solución de riego carente de nitrato o fosfato. Los cotiledones de estas plántulas se analizaron a los 8 DDI junto con cotiledones procedentes de plantas regadas con solución nutritiva estándar (control).

2.1.3.8. Análisis de diferentes órganos de planta adulta de judía

Se analizaron flores en diferentes momentos de su desarrollo: primordio floral, flor joven y flor senescente, así como frutos agrupados en base a su tamaño, de 4 cm, 10 y 12 cm aproximadamente. Los frutos de mayor tamaño contenían en su interior semillas en desarrollo por lo que se separaron en vaina y en semilla, analizándose por separado. En todas las muestras se determinó la actividad nucleasa se llevó a cabo según se indica en el apartado 5.1, utilizando tampón acetato 50 mM (pH 5,5) y TES 50 mM (pH 7), en ausencia y presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}) normalizando frente a la cantidad de proteína soluble (10 μg) y desarrollándola tras incubar a 50 °C durante 60 min

(apartado 5.1.1). La expresión de los genes de las nucleasas de la familia de nucleasas S1/P1 se analizó en todas las muestras (apartado 15).

2.1.3.9. Análisis de la senescencia en hojas de judía

El estudio se realizó en la primera hoja trifoliada de plantas de judía determinando el nivel de proteína soluble (apartado 4.1), el nivel de clorofila a y b (apartado 4.4) y de ureidos (apartado 4.3). La actividad nucleasa también se determinó según se indica en el apartado 5.1 de Material y Métodos, utilizando tampón acetato 50 mM (pH 5,5) y TES 50 mM (pH 7), en ausencia y presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}) normalizando frente a la cantidad de proteína soluble (10 μg) y desarrollándola tras incubarla a 50 °C durante 20 min cuando se usaron como sustratos ADNmc y ARN, mientras que para ADNbc durante 60 min (5.1.1). La expresión de los genes de las nucleasas de la familia de nucleasas S1/P1 se analizó en todas estas muestras (apartado 15).

- *Senescencia Natural*. Las primeras hojas trifoliadas de judía se recogieron a diferentes momentos del desarrollo de la planta de un intervalo comprendido entre los 25 y 42 DDI. El estudio se realizó por triplicado.
- *Senescencia Inducida*. La senescencia inducida se llevó a cabo sometiendo a oscuridad total a la primera hoja trifoliada de diferentes plantas, siguiendo dos aproximaciones experimentales distintas. En la primera (SIO.1), tres hojas se aislaron de diferentes plantas de 25 DDI con la ayuda de una cuchilla estéril y se depositaron en el interior placas de Petri de 120 mm (una hoja por cada placa), que contenían tres discos de papel en la base y uno en la tapa, humedecidos con agua destilada estéril para mantener la humedad relativa y evitar que las hojas se marchitaran. Transcurridos seis días se recogieron y se analizaron frente a tres hojas recogidas a los 25 DDI que actuarían como los controles. El siguiente método (SIO.2) consistió en envolver con papel de aluminio la primera hoja trifoliada de diferentes plantas a los 25 DDI, manteniéndose así durante seis días y recogiendo

finalmente, junto con otras tres hojas procedentes de plantas diferentes de 31 DDI y cultivadas en condiciones estándar, que actuarían como los controles del experimento.

2.2. Cultivos bacterianos

2.2.1. Estipes bacterianas

Se utilizaron dos cepas diferentes del organismo *Escherichia coli*, la cepa DH5 α y la BL21. La cepa DH5 α es una estirpe que está modificada genéticamente y que resulta deficiente en algunos de los componentes del sistema de restricción y modificación de bacterias. Esta cepa es útil para obtener células competentes para su transformación. La cepa BL21 (DE3) es una estirpe deficiente en diferentes proteasas celulares y que contiene en su genoma el gen de la ARN polimerasa T7, cuyo promotor es inducible por IPTG. Esta cepa resulta idónea para la expresión heteróloga de proteínas en *E. coli*.

2.2.2. Condiciones de cultivo

Las dos cepas se cultivaron de forma rutinaria a 37 °C en medio LB (Luria-Bertani) esterilizado en el autoclave durante 20 min a 126 °C. A los medios de cultivo se les adicionó los diferentes suplementos tras enfriarse y al alcanzar aproximadamente los 50 °C.

- Medio de cultivo LB: compuesto por 10 g de NaCl, 10 g bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y agua destilada hasta un volumen de 1 l. A los medios sólidos se debe añadir agar 1,5% (p/v), previamente a la esterilización por autoclave, distribuyéndose posteriormente en placas de Petri estériles de 50 mm de diámetro.

2.2.3. Obtención de células competentes de *E. coli*

La estirpe bacteriana se cultivó en medio LB en agitación a 240 rpm y a 37 °C durante aproximadamente 14 h. Con este cultivo se inoculó un medio LB fresco y se incubó a 37 °C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0,5. El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y a partir de ese momento todo el proceso se realizó a 4 °C. Las células se recogieron por centrifugación a 2800 g durante 5 min y se resuspendieron en CaCl₂ 50 mM estéril y frío, utilizando un volumen igual a la mitad del volumen inicial de medio LB fresco. Estas células competentes se almacenaron a -80 °C tras añadir glicerol a una concentración final del 10% (v/v).

3. Obtención de extractos crudos

3.1. Extractos crudos a partir de material vegetal

El material vegetal fresco obtenido de cada experimento, tras pesarlo y fotografiarlo, se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido y se mantuvo a -80 °C hasta su uso. En el momento de su análisis, el material se pulverizó con nitrógeno líquido y se trituró a 4 °C con tampón de extracción en una relación entre 4 y 10 ml por cada gramo de peso fresco, según el tipo de tejido. Salvo que especifique lo contrario, el tampón de extracción estaba compuesto de TES 50 mM (pH 7) y DOC al 0,15% (p/v). Finalmente, la suspensión homogénea obtenida se incubó en hielo durante 15 min y se centrifugó durante 10 min a 24000 g a 4 °C, separando el sobrenadante resultante en partes alícuotas que se mantuvieron almacenadas a -20 °C.

3.2. Extractos crudos a partir de *Escherichia coli*

Las bacterias transformadas con la construcción de interés y obtenidas de 25 ml de cultivo líquido se resuspendieron en 5 ml de tampón de lisis que contenía: urea 8 M, NaCl 300 mM, PSMF 1 mM, disueltos en TES 50 mM (pH 7) y se rompieron por ultrasonidos en un equipo Vibra Cell (Sonic and Materials INC.,

Danbury, Connecticut, USA), aplicando 6 pulsos de 5 s cada uno, manteniendo las muestras siempre a 4 °C. El homogenado se centrifugó a 12000 g durante 15 min y a 4 °C, obteniéndose un sobrenadante que se denominó extracto crudo de lisis y el precipitado con los restos celulares. En condiciones desnaturalizantes se añadió urea al tampón de lisis.

4. Determinaciones analíticas

4.1. Determinación de la concentración de proteína soluble

La concentración de proteína se determinó mediante el método Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) basado en el método de Bradford (1976) y utilizando seroalbúmina bovina como patrón. La concentración de proteína en los perfiles cromatográficos se estimó mediante la medida directa de la absorbancia a 280 nm.

4.2. Determinación de aminoácidos libres

La cantidad de aminoácidos solubles se determinó mediante el método de la ninhidrina-metilcelosolve descrito por Yemm y Cocking (1955). Una cantidad adecuada de extracto crudo se diluyó hasta un volumen final de 1 ml con agua y se le añadieron 0,5 ml de tampón citrato 0,2 M (pH 5,0). A continuación, se le añadieron 0,2 ml de la solución compuesta por ninhidrina al 0,5% (p/v) en metilcelosolve (2-metoxietanol) y 1 ml de una solución acuosa de ácido ascórbico al 0,1% (p/v). Tras agitar para mezclar, se incubaron las muestras en un baño a 100 °C durante 15 min. Una vez enfriadas las muestras con agua y hielo durante 2 min, se añadieron 2 ml de agua destilada. Finalmente, se determinó la absorbancia a 405 y 575 nm. El coeficiente de extinción molar de la mayoría de los aminoácidos es próximo a $24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, por lo que este fue el valor con el que se determinó la concentración de aminoácidos totales.

4.3. Determinación de ureidos totales

La concentración de ureidos totales se determinó mediante el ensayo colorimétrico descrito por van de Drift (1970). Este método se basa en la transformación físico-química diferencial de los diferentes ureidos a glioxilato, el cual, en presencia de fenilhidrazina y en medio ácido forma difenilformazán del glioxilato, que es un compuesto coloreado con un máximo de absorbancia a 520 nm. Para la determinación de la concentración de ureidos se tomó una cantidad adecuada de extracto crudo y se mezcló con agua destilada hasta un volumen final de 0,6 ml. A continuación, se añadieron 0,2 ml de NaOH 0,5 M y se incubó a 100 °C durante 10 min. Después de enfriar, se añadieron 0,2 ml de tampón fosfato 0,4 M (pH 7) y 0,2 ml de fenilhidrazina-HCl 22,8 mM. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente se le añadió 1ml de HCl 12 N a 4 °C y 0,2 ml de ferricianuro potásico 48,6 mM. Transcurridos 15 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 520 nm. El coeficiente de extinción molar del producto final fue de 42,36 mM⁻¹cm⁻¹.

4.4. Determinación de las globulinas

Las globulinas 7S se extrajeron siguiendo el protocolo descrito en Carbonaro (2006) con pequeñas modificaciones. Los tejidos se homogenizaron con el tampón Tris-HCl 0,15 M (pH 8,5) con la ayuda de un mortero y a 4 °C. La relación de tampón por gramo de peso fresco fue de 4 para ejes y 6 para cotiledones. Tras centrifugar a 4 °C durante 10 min a 12000 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 a 4 °C durante 10 min a 12000 g, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados en un volumen igual al inicial con tampón Tris-HCl 0,025 M (pH 8,5). Los extractos obtenidos se sometieron a SDS-PAGE tras mezclar previamente con tampón de carga en presencia de agentes desnaturizantes e

incubaron 3 min a 95 °C. Tras la electroforesis el gel se tiñó con solución Coomassie de un sólo paso.

4.5. Determinación de las clorofilas

El contenido en clorofilas se determinó mediante el método descrito por Lichtenthaler (1987) que se basa en la extracción de las clorofilas del tejido mediante sucesivos lavados con acetona al 80% (v/v). Se utilizó 0,09 gramos de material vegetal almacenado a -80 °C. Este material se pulverizó con nitrógeno líquido y se le añadió 1,5 ml de una solución acuosa de acetona al 80%. Tras mezclar por agitación con la ayuda de un vórtex, se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 12000 g y se recogió el sobrenadante. La extracción con acetona al 80% se repitió tres veces más. Habitualmente, el precipitado obtenido tras estas 4 extracciones era de color blanco indicando la ausencia de pigmentos. Los sobrenadantes obtenidos en cada una de las extracciones se mezclaron y se determinó su absorbancia a 663 y 645 nm. La concentración de clorofila a y b se determinó mediante las siguientes fórmulas algebraicas:

- Clorofila a ($\mu\text{g/ml}$) = $12,25 \cdot A_{663} - 2,79 \cdot A_{646}$
- Clorofila b ($\mu\text{g/ml}$) = $21,5 \cdot A_{646} - 5,1 \cdot A_{663}$

5. Ensayos enzimáticos

5.1. Determinación de la actividad nucleasa

5.1.1. Ensayo en gel

El ensayo de la actividad nucleasa en gel de acrilamida se realizó según se describe en Yen y Green (1991) con algunas modificaciones. Los geles se prepararon como se indica en el apartado 6 incluyendo en la mezcla del gel separador ADN como sustrato de la reacción (obtenido de testículos de salmón, D1626 Sigma Aldrich). El ADN se disolvió en agua miliQ a una concentración final de 0,24 mg/ml y antes de añadirlo al gel se desnaturalizó hirviéndolo

durante 5 min. Los extractos se cargaron en el gel normalizando frente a la cantidad de proteína soluble (10 o 15 µg) o por peso fresco (5 µl, utilizando un ratio de tampón:peso fresco de 4 a 10 ml:g), tras mezclar con tampón de carga (Laemmli 1970) en una relación 1/3 y en ausencia de agentes reductores. Las muestras con tampón de carga se incubaron durante 10 min a 65 °C. La electroforesis se llevó a cabo aplicando 100 V y a 4 °C, como se indica en el apartado 6. A continuación, los geles se sometieron a dos lavados durante 10 min con una solución tampón de acetato 10 mM (pH 5,5) o TES 10 mM (pH 7) que contenía isopropanol al 25% (v/v) para retirar el SDS de los geles. Posteriormente, los geles se lavaron dos veces durante 10 min con acetato 10 mM (pH 5,5) o TES 10 mM (pH 7), respectivamente, para retirar el isopropanol. Todos los lavados se realizaron a 4 °C y en agitación constante. Por último, la actividad se desarrolló incubando los geles a 50 °C en presencia de tampón acetato 50 mM (pH 5,5) o TES 10 mM (pH 7) durante un tiempo variable de incubación (de 5 a 90 min) en función de la muestra. Para detectar la actividad los geles se tiñeron con una solución acuosa que contenía Azul de Toluidina O (Sigma-Aldrich, detectándose la actividad como tinción negativa. Los geles fueron digitalizados mediante el sistema UVIDoc system y GelDocTM EZ Imager (Bio-Rad), cuya imagen invertida se muestra como los resultados.

5.1.2. Ensayo *in vitro*

El ensayo de la actividad nucleasa *in vitro* se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en Wood y col. (1998), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción del ensayo estaba compuesta por la cantidad adecuada de extracto crudo, BSA a una concentración final de 1 mg/ml, tampón acetato 50 mM (pH 5,5) o TES 50 mM (pH 7) y como sustrato ADN (obtenido de testículos de salmón, D1626, Sigma Aldrich), disuelto en agua miliQ y desnaturalizado tras hervir 10 min. El ADN desnaturalizado se añadió

inmediatamente a la mezcla de reacción a una concentración final de 0,5 mg/ml. El volumen final de la mezcla de reacción fue 0,6 ml y la reacción se llevó a cabo en un baño termostatzado a 35 °C. En diferentes tiempos se fueron tomando partes alícuotas de 0,3 ml a las que se le adicionó 1 ml de ácido perclórico al 3,4% (v/v). Tras homogenizar por inversión suave se centrifugó a 24100 g a 4 °C durante 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 260 nm y la actividad nucleasa se determinó por el incremento de la absorbancia en un periodo de tiempo. Este incremento viene dado por el aumento en la concentración de nucleótidos o pequeños fragmentos de ADN en el sobrenadante como consecuencia de la hidrólisis del ADN, quedando en el precipitado las moléculas de ADN sin digerir. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que produce un incremento en la absorbancia de 0,01 por minuto de acuerdo a Yupsanis y col. (2004).

5.2. Determinación de la actividad ribonucleasa

5.2.1. Ensayo en gel

El ensayo se realizó como se ha descrito para la nucleasa en el apartado 5.1.1 pero utilizando ARN como sustrato (obtenido de levadura, R3629, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1mg/ml, en lugar de ADN.

5.2.2. Ensayo *in vitro*

El ensayo se realizó como se ha descrito para la nucleasa en el apartado 5.1.2 pero utilizando ARN como sustrato (obtenido de levadura R3629, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,5 mg/ml, en lugar de ADN.

5.3. Determinación de la actividad alantoinasa

Para la determinación de la actividad alantoinasa se siguió el protocolo descrito en Raso y col. (2007b) basado en la cuantificación de la formación de alantoato

mediante el método descrito por van der Drift (1970). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1,6 ml en un baño termostatzado a una temperatura de 35 °C. La mezcla de reacción estaba compuesta por la cantidad adecuada de extracto crudo, utilizando alantoína 12 mM como sustrato disuelta en Tris-HCl 50 mM (pH 7,8) junto con MnSO₄ 1 mM. El proceso se llevó a cabo extrayendo de la mezcla de reacción a distintos tiempos, partes alícuotas de 0,2 ml que se mezclaron con 0,2 ml de HCl 0,15 N y 0,6 ml de agua destilada fría. Tras incubar a 100 °C durante 10 min, se determinó el glioxilato. En todos los ensayos se realizaron controles para determinar la producción no enzimática de alantoato. La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 µmol de sustrato por min.

6. Electroforesis de proteínas

6.1. Separación de proteínas en gel de acrilamida

La separación electroforética de proteínas en geles de acrilamida con SDS se realizó según se describe en Laemmli (1970) utilizando mini geles (20cm x 20 cm) del sistema de electroforesis miniprotean III (Bio-Rad). En condiciones desnaturizantes y reductoras las muestras se mezclaron con tampón de carga en relación 1/3 (v/v) en presencia de β-mercaptoetanol como agente reductor y se incubaron a 100 °C durante 5 min. En condiciones no reductoras las muestras se mezclaron con tampón de carga en ausencia de agente reductor y no se calentaron. La electroforesis siempre se llevó a cabo a 100 V y a 4 °C.

En los geles se incluyeron marcadores de masa molecular que permitían estimar el tamaño y la cantidad de proteína presente en cada uno de los pocillos. Se utilizaron los marcadores de peso molecular pre-teñidos: PageRule Prestained Protein Ladder (Thermo scientific) que consiste en péptidos de 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 y 10 kDa.

- Composición de geles y tampones:
 - Gel concentrador: tampón Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS al 0,1% (p/v), APS al 0,05% (p/v), TEMED al 0,1% (p/v) y acrilamida/bisacrilamida al 4%.
 - Gel separador: tampón Tris-HCl 1,5 mM (pH 8,8), SDS al 0,1% (p/v), APS al 0,05% (p/v), TEMED al 0,1% (p/v) y acrilamida/bisacrilamida en un porcentaje comprendido entre 8 y 10%.
 - Tampón de electroforesis: Tris 250 mM (pH 8,3), glicina 520 mM y SDS al 0,1% (p/v).
 - Tampón de carga Laemmli: Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), SDS al 2% (p/v), azul de bromofenol al 0,02% (p/v) y glicerol al 10% (v/v). En condiciones reductoras se utilizó la misma composición pero se añadió β -mercaptoetanol a una concentración final de 715 mM.

6.2. Tinción de los geles de acrilamida

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de Azul de Coomassie diluido o tinción de plata mediante los procedimientos que se describen a continuación:

6.2.1. Tinción con solución Azul de Coomassie

Los geles de acrilamida se sumergieron en solución azul de Coomassie diluido, permaneciendo en agitación constante y a temperatura ambiente hasta alcanzar el grado de tinción deseado (Zehr *et al.* 1989). Debido a la baja concentración del colorante, esta solución sólo tiñe las proteínas y, por tanto, no resulta necesario desteñir posteriormente los geles. La solución de Coomassie estaba compuesta de etanol al 10% (v/v), ácido acético al 5% (v/v) y Coomassie R-250 al 0,0016% (p/v).

6.2.2. Tinción con solución de plata

Cuando se requería mayor sensibilidad los geles se tiñeron con solución de plata utilizando el Kit Silver Stain (Bio Rad) basado en el procedimiento descrito por Hesukeshoven y Dernick (1985). El primer paso consiste en incubar el gel en una solución compuesta por agua miliQ, etanol y ácido acético en una proporción 55/30/15 (v/v/v) durante al menos una hora para fijar las proteínas. A continuación, se sumerge en una solución compuesta por agua miliQ, etanol y glutaraldehído en una proporción 75/25/0,125 (v/v/v) además de acetato sódico 0,5 M y tiosulfato sódico 8,3 mM, durante un intervalo de tiempo comprendido entre 1 y 12 h. Posteriormente, se lava tres veces con agua miliQ, durante 10 min cada lavado, y se añade una solución acuosa de nitrato de plata 6 mM y formaldehído al 0,011% (p/v) incubando durante 30 min. Todas las incubaciones se realizan en agitación constante y a temperatura ambiente. Por último, se hacen dos lavados cortos de 10 s con agua miliQ y se añade la solución de revelado compuesta por carbonato sódico 236 mM y formaldehído al 0,011% (p/v) en agua miliQ, manteniéndose en agitación suave. Cuando se alcanza la coloración deseada se retira la solución de revelado y se detiene la reacción añadiendo EDTA 50 mM.

7. Electrotransferencia y Western blot

Tras realizar la electroforesis, las proteínas del 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 previamente sumergiéndola en metanol absoluto durante 1 min y que se mantuvo sumergida en tampón de transferencia hasta su uso. La transferencia se realizó aplicando 200 mA durante 90 min a 4 °C, independientemente del sistema utilizado. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó con tampón T-TBS y se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en tampón T-

TBS a temperatura ambiente durante 30 min y en agitación constante. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario (H1029, Sigma-Aldrich) diluido en T-TBS (1:5.000) suplementado con un 0,5% (p/v) de leche desnatada en polvo durante 12 h y a temperatura ambiente. Estos anticuerpos son monoclonales y reconocen las colas de histidina de las proteínas recombinantes. El anticuerpo se retiró lavando la membrana tres veces con T-TBS, durante 10 min cada lavado. Se añadió como anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G de ratón desarrollada en cabra y conjugada con fosfatasa alcalina (A3562 de Sigma-Aldrich) en T-TBS (1:10.000). Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se lavó 3 veces con T-TBS durante 10 min cada lavado, y finalmente, se desarrolló la actividad fosfatasa alcalina mediante la adición de revelado sobre la membrana de PVDF. Una vez desarrollado el color púrpura (1-5 min), la reacción se detuvo tras realizar varios lavados con agua destilada.

- Tampones utilizados:
 - Tampón de electrotransferencia: Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y metanol al 20%.
 - Tampón TBS: Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) y NaCl 137 mM.
 - Tampón T-TBS: Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), NaCl 137 mM y Tween-20 al 0,1% (v/v).
 - Tampón de desarrollo: Tris-HCl 100 mM (pH 9,5), MgCl₂ 5 mM, BCIP 0,4 mM y NBT 0,37 mM.

8. Purificación de proteínas

8.1. Purificación de una proteína con actividad nucleasa a partir de ejes en desarrollo de judía

Todos los pasos de la purificación se realizaron a 4 °C, utilizando como tampón de trabajo TES 50 mM (pH 6,5). El extracto crudo se obtuvo a partir de 25 g de

ejes de plántulas de 5 DDI, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3. Los diferentes pasos que se siguieron en la purificación se detallan a continuación:

8.1.1. Precipitación fraccionada con sulfato amónico

Al extracto crudo se le fue añadiendo lentamente sulfato amónico en agitación suave y a 4 °C hasta alcanzar una saturación del 65% y se mantuvo en estas condiciones durante 30 min. La suspensión resultante se centrifugó a 22000 g y a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se recogió y se repitió el proceso añadiendo de nuevo sulfato amónico hasta alcanzar una saturación del 90% y se volvió a centrifugar a 22000 g y a 4 °C durante 15 min. El precipitado resultante se resuspendió en el tampón de trabajo en un volumen menor al inicial para concentrar la muestra. A continuación, la preparación enzimática se dializó utilizando una membrana de celulosa siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 9.

8.1.2. Tratamiento térmico

A la preparación enzimática procedente del paso anterior se le añadió ZnCl₂ 5 mM y se calentó a 60 °C durante 30 min. Tras incubar a 4 °C durante 30 min, se centrifugó a 22000 g y a 4 °C durante 10 min. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se sometió al siguiente paso de purificación.

8.1.3. Cromatografía de intercambio iónico

El sobrenadante obtenido en el paso de purificación anterior se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel utilizando una columna de 1 ml (GE Healthcare) acoplada a un sistema ÄKTA purifier HPLC (GE Healthcare). La columna fue equilibrada previamente con el tampón de trabajo. Tras la carga, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de trabajo y la elución de las proteínas se llevó a cabo mediante un

gradiente en 30 volúmenes de columna de NaCl desde 0 a 0,5 M. Por último, la columna se lavó con 5 volúmenes de tampón de trabajo suplementado con NaCl 1 M. Todo el proceso se realizó a un flujo de 1 ml/min y las fracciones que se recogieron fueron de 1 ml, a las que se les midió la concentración de proteína (apartado 4.1) y la actividad nucleasa mediante ensayo *in vitro* (apartado 5.1.1). Las fracciones con actividad se reunieron y se dializaron como se describe en el apartado 9.

8.1.4. Cromatografía de afinidad a la concanavalina-A

La preparación enzimática procedente de la cromatografía de intercambio iónico y dializado se sometió a una cromatografía de afinidad en una columna con concanavalina-A, la ConA-Sepharose de 1 ml (GE Healthcare) acoplada a un sistema ÄKTA purifier HPLC (GE Healthcare). La columna se equilibró previamente con el tampón TES 50 mM (pH 7,4) suplementado con NaCl 0,500 mM, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM. Tras la carga, la columna se lavó con 5 ml de tampón de trabajo y la elución se realizó en un gradiente de 30 volúmenes de columna de 0 a 0,5 M de metil α -D-manopiranososa, seguidos de 8 volúmenes de 0,5 M de metil α -D-manopiranososa. Todo el proceso se realizó a un flujo de 0,5 ml/min y las fracciones recogidas fueron de 1 ml, a las que se les midió la concentración de proteína (apartado 4.1) y la actividad nucleasa mediante ensayo *in vitro* (apartado 5.1.1). Las fracciones con actividad se reunieron y se dializaron como se describe en el apartado 9.

8.2. Purificación de la proteína PVN2 recombinante

La proteína recombinante con colas de histidinas y expresada en *E. coli* se purificó por unión a Ni²⁺ en una columna de 1 ml de Chelating sepharose (GE Healthcare) preparada siguiendo las indicaciones del fabricante. La purificación se llevó a cabo bajo condiciones desnaturalizantes que permitieran la solubilización de la proteína. En la columna se aplicaron 5 ml de extracto

crudo de lisis procedente del cultivo de células que contenían la construcción con la proteína recombinante., en presencia de con urea 8 M y tras incubar 5 min a 100 °C. A continuación, se lavó con 5 ml tampón de lisado y se lavó tres veces la columna con 2 ml de tampón de lisado que contenía imidazol en una concentración creciente: 75, 100 y 200 mM, con los que se eluyó la proteína. Las fracciones obtenidas se mantuvieron a 4 °C para su posterior análisis mediante SDS-PAGE y Western blot. La purificación de la proteína en condiciones no desnaturizantes se llevó a cabo del mismo modo pero en ausencia de urea.

9. Diálisis de proteínas

La diálisis se llevó a cabo introduciendo el extracto proteico en el interior de una membrana de celulosa de 25 mm (D9777, Sigma-Aldrich) que previamente se lavó con abundante agua desionizada durante al menos 14 h a 4 °C. La membrana de diálisis se colocó en un vaso de precipitado que contenía 1 l de tampón de trabajo correspondiente y se mantuvo en agitación constante durante 12 h a 4 °C. El proceso se repitió con tampón nuevo 3 veces más, en las mismas condiciones durante 1 h.

10. Caracterización de la nucleasa de 37 kDa de ejes embrionarios de judía

La caracterización de la proteína de 37 kDa con actividad nucleasa se realizó mediante el ensayo en gel (apartado 5.1.1) utilizando como fuente de enzima extracto crudo obtenido a partir de ejes de 3 DDI cargando por cada carril 10 o 15 µg de proteína.

10.1. Especificidad de sustrato

La actividad nucleasa se determinó utilizando como sustrato ADN_{mc} (hervido 5 min), ADN_{bc} (sin hervir) y ARN, todos a la concentración final de 1 mg/ml

en tampón acetato 50 mM (pH 5,5). La actividad se determinó a 50 °C durante 10 min.

10.2. Determinación de la temperatura y pH óptimos

La temperatura óptima se determinó incubando los geles a diferentes temperaturas (10, 20, 30, 40, 50 y 60 °C). El pH óptimo se estudió desarrollando la actividad nucleasa a valores de pH comprendidos entre 4,5 y 8,5. En ambos casos, la actividad se desarrolló a 50 °C durante 10 min.

10.3. Efecto del EDTA y de cationes divalentes

El efecto del EDTA en la actividad nucleasa se analizó incubando tiras del gel con diferentes concentraciones de agente quelante durante 12 h, en agitación constante y a 4 °C. A continuación, la actividad se desarrolló a 50 °C durante 10 min.

La recuperación de la actividad por cationes tras inhibir con el tratamiento por EDTA se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento. Las tiras de gel se incubaron durante 1 h con acetato 50 mM (pH 5,5) que contenía EDTA 1 mM. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 min con acetato 50 mM (pH 5,5) para retirar el agente quelante y las tiras de gel se incubaron con tampón de ensayo que contenía los cationes, Ca^{2+} , Mg^{2+} o Zn^{2+} a una concentración final de 5 mM durante 12 h. A continuación, se desarrolló la actividad a 50 °C durante 10 min. Todas las incubaciones y lavados del ensayo se realizaron a 4 °C y en agitación constante.

El efecto de los cationes y el pH en la actividad nucleasa de 37 kDa u otras nucleasas se realizó desarrollando la actividad nucleasa en gel en tampón acetato 50 mM (pH 5,5) y TES 50 mM (pH 7) en ausencia o presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} o Zn^{2+}) a una concentración final de 0,1 mM.

10.4. Efecto de la concanavalina-A

Extracto crudo se incubó con la proteína concanavalina-A, en una relación de 12 µg de concanavalina por 10 µg de extracto crudo, durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente, se determinó la actividad.

10.5. Efecto del Pi y PPI

Las tiras de gel se incubaron con acetato 50 mM (pH 5,5) suplementado con Pi y PPI (concentraciones entre 0 y 5 mM) en agitación constante y a 4 °C, durante 1 h. A continuación se desarrolló la actividad nucleasa a 50 °C durante 10 min, en presencia de estos compuestos.

11. Caracterización e identificación de la nucleasa de 37 kDa purificada

Las principales características de la actividad nucleasa de la proteína resultante de la purificación, se analizaron mediante ensayo *in vitro*, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.1.2. Salvo que se especifique lo contrario, siempre se utilizó 10 µl de proteína pura y se desarrolló la actividad a 35 °C durante 10 min.

Para estudiar la cantidad óptima de ADNmc como sustrato para el ensayo, se determinó la actividad utilizando en la mezcla de reacción diferentes concentraciones de ADNmc (0, 0,5 1, 1,5 y 2 mg/ml). El pH óptimo se obtuvo incluyendo en la mezcla de reacción diferentes tampones (acetato, succinato, MES y TES 50 mM) ajustados a diferentes valores de pH comprendidos en un rango entre 4,5 y 8. La temperatura óptima del ensayo se analizó incubando la mezcla de reacción a diferentes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C y desarrollando posteriormente el ensayo de la actividad en condiciones estándar. El efecto de los cationes divalentes en el ensayo de la actividad *in vitro* se determinó adicionando a la mezcla de reacción Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} a una

concentración final de 12 mM, incubando previamente la preparación enzimática con EDTA 3,3 mM durante 90 min a temperatura ambiente.

La proteína purificada se sometió a SDS-PAGE en ausencia de agentes reductores y calor. Tras la electroforesis, se tiñó con plata y la porción del gel de acrilamida que contenía la proteína se recortó y se analizó en la unidad de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid). En primer lugar, la muestra se sometió a una digestión por tripsina y la huella peptídica se analizó mediante programas informáticos para buscar homología con otras proteínas incluidas en sus bases de datos, no identificándose ninguna proteína. A continuación, la proteína se sometió a secuenciación de novo y los espectros obtenidos se analizaron empleando el programa Peaks 6.0 Bioinformatics solutions, y el motor de búsqueda MASCOT.

12. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

Para el aislamiento de ácidos nucleicos se empleó material libre de ribonucleasas y estéril. Por tanto, todo el material empleado se esterilizó dos veces en el autoclave durante 20 min a 126 °C.

12.1. Aislamiento y purificación de ARN total

12.1.1. Extracción con TRI Reagent

El ARN total se extrajo a partir de muestras congeladas y pulverizadas con nitrógeno líquido, utilizando el reactivo comercial TRI Reagent (Sigma Aldrich). El proceso se basa en la disociación de proteínas y la eliminación de componentes no hidrosolubles mediante una separación en fases con distinta solubilidad. Se siguieron las indicaciones de la casa comercial.

El proceso siempre se llevó a cabo en el interior de la cámara de extracción de gases. En primer lugar, se añadió 1 ml de reactivo por cada 100 mg de tejido

pulverizado y se mezcló inmediatamente por agitación. A continuación, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para disociar los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 0,2 ml de cloroformo mezclando muy suavemente por inversión durante unos segundos y se centrifugó a 24000 g durante 15 min a 4 °C, separándose la mezcla en dos fases. La fase inferior contiene lípidos, proteínas solubles y restos celulares, mientras que la fase superior de menor densidad contiene el ARN junto con polisacáridos y otras pequeñas moléculas hidrosolubles, quedando en la interfase las moléculas de ADN. Se recogió cuidadosamente la fase superior y se transfirió a un vial de 2 ml añadiendo 0,5 ml de isopropanol y tras mezclar suavemente por inversión, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 24000 g durante 15 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 75% sobre el precipitado que se centrifugó nuevamente a 24000 g durante 5 min y a 4 °C para lavar el precipitado. Después, se eliminó el sobrenadante y tras dejar secar el precipitado, se resuspendió en 200 µl de agua miliQ estéril y se añadieron 133 µl de cloruro de litio 8 M, mezclando suavemente por inversión y dejando incubar 12 h a -20 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 24000 g durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó de nuevo el precipitado con 1 ml de etanol frío al 75%, mezclando suavemente por inversión. Se centrifugó nuevamente a 24000 g durante 5 min a 4 °C. Finalmente tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en un volumen de agua miliQ comprendido entre 25 y 40 µl. Esta preparación de ARN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

12.1.2. Extracción con fenol caliente

Este procedimiento se usó en aquellas muestras en las que se obtuvo bajo rendimiento en la extracción de ARN con el método anterior. A 100 mg de tejido pulverizado se le añadió 0,25 ml de fenol a 80 °C y 0,25 ml de tampón de extracción compuesto por: Tris 100 mM (pH 8), CILi 0,1 M, EDTA 8 mM y

SDS al 1% y se homogenizó mediante el vórtex. Se añadieron posteriormente 0,250 ml de cloroformo y tras mezclar, se centrifugó a 24000 g durante 10 min a 4 °C. La fase acuosa del sobrenadante se recogió cuidadosamente y se le añadió 0,5 ml de etanol al 75% y 0,025 ml de NaAc 3 M. Se dejó incubar a -20 °C durante 30 min o 12 h. El proceso continuó tras centrifugarse a 24000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó, el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó de nuevo a 24000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 200 µl de agua miliQ esterilizada y se añadieron 133 µl de cloruro de litio 8 M, mezclando suavemente por inversión y dejando incubar 12 h a 0 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 24000 g durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol frío al 75%, mezclando suavemente por inversión. Nuevamente se centrifugó a 24000 g durante 5 min a 4 °C. Finalmente, tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en un volumen de agua miliQ comprendido entre 25 y 40 µl. El ARN aislado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

12.1.3. Cuantificación, pureza e integridad del ARN

La cuantificación y el análisis de la pureza del ARN se realizó mediante un espectrofotómetro NanoValue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare) basándose en los valores de la absorbancia de las muestras a 260, 280 y 320 nm. Valores del cociente A_{260}/A_{280} por debajo de 2 indica la presencia contaminación de naturaleza proteica, mientras que valores del cociente A_{260}/A_{320} menor a 2 indica la presencia de contaminación de naturaleza glucídica.

La integridad y la pureza del ARN se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando como tampón de electroforesis MOPS (0,5x) y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 13.2.

12.2. Aislamiento de ADN plasmídico

A partir de una colonia bacteriana que contenía la construcción de interés, se inocularon 3 ml de medio de cultivo líquido LB suplementado con los antibióticos adecuados. Tras 12-14 h en agitación a 37 °C, se tomó 1,5 ml del cultivo y se centrifugó a 1100 g durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó el aislamiento del plásmido mediante lisis alcalina y precipitación por isopropanol de las células del precipitado o bien mediante kit comercial.

12.2.1. Lisis alcalina y precipitación por isopropanol

Las bacterias del precipitado se resuspendieron en 200 µl de la solución compuesta por: glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8) y EDTA 10 mM. Tras incubación 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 400 µl de una solución compuesta por: NaOH 0,2 N y SDS al 1% (p/v), preparada justamente antes de su uso. Tras mezclar por inversión, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente provocando la lisis de las células. A continuación, se añadieron 200 µl de la solución que contenía acetato potásico 3 M y ácido acético glacial 5 M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente se centrifugó a 24000 g durante 15 min a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante. Un volumen de 540 µl de isopropanol se mezcló con el sobrenadante obtenido y tras mezclar por inversión suavemente, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, permitiendo la precipitación de los ácidos nucleicos cuando se centrifugó a 24000 g durante 15 min a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, sobre el precipitado se añadió 1 ml de etanol 75% y se mezcló suavemente por inversión. Tras centrifugar nuevamente a 24000 g durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Finalmente se resuspendió el precipitado en 20 µl de agua miliQ estéril junto con 2 µl de ARNasa (5 U/ µl; R4875 de Sigma-Aldrich), y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

12.2.2. Kits comerciales

A partir del precipitado de bacterias obtenido, se aisló el plásmido mediante el kit comercial FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN), siguiendo detenidamente las indicaciones del fabricante.

12.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN

Se utilizaron los Kits comerciales QIAquick Gel Extraction (Quiagen) y QIAquick PCR Purification (Qiagen). El uso de estos Kits permitió purificar el fragmento de ADN de interés directamente a partir de productos de PCR, eliminando los componentes de la reacción de PCR, o bien aislar fragmentos de ADN tras su separación por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, siguiendo el procedimiento que se describe en el apartado 13.1.

13. Electroforesis de ácidos nucleicos

13.1. Electroforesis de ADN

La separación electroforética del ADN se llevó a cabo empleando geles de agarosa con un porcentaje entre 0,8 y 1,2%, en función de las moléculas de ADN a separar, disuelta en tampón TBE (0,5x) y suplementado con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó aplicando un voltaje comprendido entre 30 y 120 V y utilizando el tampón TBE (1x). Las preparaciones de ADN se mezclaron de forma rutinaria con un volumen adecuado de tampón de carga de ADN. Los productos de PCR en los que se utilizó la polimerasa Go taq Flexi (Promega) se cargaron directamente en el gel. Con la finalidad de estimar la cantidad y tamaño del ADN, siempre se cargó junto a la muestra un marcador de peso molecular. Como marcadores se utilizaron 500 ng de ADN procedente del fago γ digerido con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII (Fermentas), o bien el marcador de masa molecular de 100 pb Ladder (Biotools). La visualización de las moléculas de ADN y digitalización del gel se realizó tras la exposición del gel a luz UV en un transiluminador.

- Soluciones tampón de la electroforesis de ADN:
 - Tampón TBE (10x): Tris-HCl 90 mM (pH 8), H₃BO₃ y EDTA 2 mM.
 - Tampón de carga de ADN (6x): Tris-HCl 10 mM (pH 7,6) EDTA 60 mM, azul de bromofenol al 0,03% (p/v), xilen-cianol FF al 0,03% (p/v) y glicerol al 30% (p/v).

13.2. Electroforesis de ARN

El ARN aislado se mezcló con el tampón de carga en una relación 1/3 (v/v) y calentando previamente a la carga a 65 °C durante 10 min. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% en tampón TBE y utilizando como tampón de electroforesis TBE (0,5x). La electroforesis se realizó entre 50 y 100 V. La imagen del ARN aislado se obtuvo visualizando el gel con un transiluminador de luz UV. Previamente a la electroforesis, se lavó la cubeta y se utilizó tampón de electroforesis de uso único, para evitar contaminación por ribonucleasas.

- Soluciones tampón de la electroforesis de ARN:
 - Tampón de carga de ARN (3x): MOPS (1,25x), formaldehído al 9,25% (v/v), formamida desionizada al 62,5% (v/v), azul de bromofenol al 0,03% (p/v), xilen-cianol FF al 0,03% (p/v) y bromuro de etidio al 0,0025% (p/v).
 - Tampón MOPS (10x): MOPS 400 mM, acetato sódico 60 mM y EDTA 0,5 mM disuelto en agua miliQ, que se ajustó a pH 7 con NaOH y se esterilizó en autoclave.

14. Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó mediante una reacción de retrotranscripción y utilizando como molde el ARN aislado de diferentes tejidos.

14.1. Tratamiento con ADNasas

En primer lugar se eliminó del ARN aislado cualquier traza de ADN genómico mediante un tratamiento con ADNasa. Para ello, se mezcló 2,5 µg de ARN con

1 µl de tampón ADNasa (10x), 1 µl (1 U) de ADNasa I (Promega) y agua miliQ estéril hasta un volumen final de 10 µl y se mantuvo a 37 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añadió de EDTA 50 mM y se incubó a 65 °C durante 10 min para inactivar la ADNasa. La ausencia de ADN genómico se comprobó mediante la detección de expresión del gen constitutivo de la actina (número de acceso KF569608.1).

14.2. Expresión de actina

Los oligonucleótidos utilizados para estudiar la expresión del gen de actina fueron los siguientes:

- ACT.1: 5'CCAAGGCCAACAGAGAGAAG 3'
- ACT.2: 5'AACCGAAGAATTGCATGAGG 3'

La reacción de PCR estaba compuesta por: 4 µl de tampón GoTaq Flexi (5x), 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl dNTPs 10 mM, 1 µl de oligonucleótido ACT.1 5 µM y 1 µl de oligonucleótido ACT.2 5 µM (Invitrogen), 0,1 µl (0,5 U) de enzima ADN polimerasa, GoTaq Flexi Polimerase (Promega), 1 µl de ARN tratado con ADNasa I y agua miliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Las condiciones de esta PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 25 ciclos de 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 40 s y una extensión final a 72 °C durante 10 min. El producto de esta PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 13.1.

14.3. Reacción de retrotranscripción

El ADNc se sintetizó a partir de 2,5 µg de ARN aislado libre de contaminación genómica tratando con 1 µl de Oligonucleótido dT₁₂₋₁₈ 25 µM e incubando a 65 °C durante 10 min. A continuación, se añadió 4 µl de tampón RT, 2 µl de dNTPs, 1 µl de enzima retrotranscriptasa Rever Avid (Fermentas) y 2 µl de de

agua miliQ, incubando a 65 °C durante 10 min y posteriormente a 70 °C durante 15 min. Para analizar la cantidad e integridad del ADNc sintetizado, se utilizó 1 µl como molde estudiando la expresión del gen de actina siguiendo el procedimiento descrito para la PCR del apartado 14.2. El ADN sintetizado se almacenó a -20 °C, hasta su uso.

15. Análisis de expresión de genes mediante RT-PCR semicuantitativa

La expresión de los genes de la familia S1/P1 se analizó mediante RT-PCR. Esta técnica informa de la expresión de un determinado gen comparando su expresión con el del gen de la actina que se expresa constitutivamente. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para las secuencias de los extremos de cada gen de modo que originen productos de amplificación de tamaños similares. Las características de los cebadores utilizados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos

GEN	Nº DE ACCESO	OLIGONUCLEÓTIDO
ACTINA	KF569608	PvA1 5' CCAAGGCCAACAGAGAGAAG 3'
		PvA2 5' AACCGAAGAATTGCATGAGG 3'
PVN1	Phvul.003G030200	PVN1.1 5' AGAACAGGAGTTAAAAACCGATG 3'
		PVN1.2 5' CTAAATAACCGCTGCATACTTG 3'
PVN2	Phvul.003G030500	PVN1.1 5' GAAAAGTGGAATTAAGGGCGAT 3'
		PVN1.1 5' TTACATTGACATTGAAGACTGTGA 3'
PVN3	Phuvul.002G223100	PVN3.1 5' TGGTTCAGTAAGGTGATCTGA 3'
		PVN3.2 5' TGCATCGTATAGTTGTATATTCCT 3'
PVN4	Phvul.006G190700	PVN4.1 5' TAGAACTGGTACAAATATAGGTG 3'
		PVN4.2 5' TGITCCAGGTTTAACACCTTCAT
PVN5	Phvul.007G028400	PVN5.1 5' ATCGTGTGAGGTTTTATTTGGACT 3'
		PVN5.2 GGGCAAGTAGTTTCTTTAGAATTG 5' 3'

La mezcla de reacción de la PCR estaba compuesta por: 4 µl de tampón GoTaq Flexi (5x); 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM; 0,5 µl dNTPs 10 mM; 1 µl de oligonucleótido ACT.1 5 µM y 1 µl de oligonucleótido ACT.2 5 µM; 0,2 µl (0,5 U) de enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega); 1 µl de ADNc y

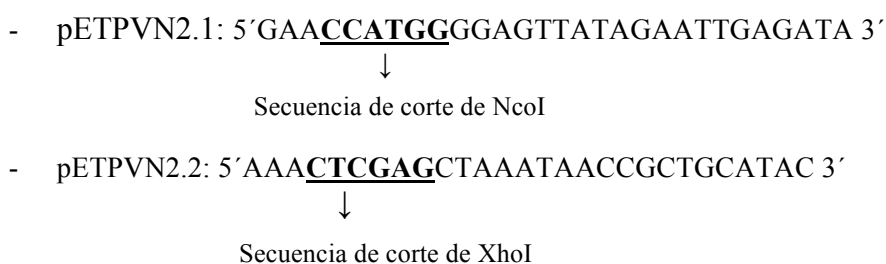
agua miliQ estéril hasta 20 μ l. Las condiciones de esta PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, seguida de 25 o 27 ciclos de amplificación, para estudiar la expresión de la actina o de las nucleasas respectivamente. Cada ciclo consistió en una desnaturalización a 95 °C durante 2 min, un alineamiento a 58 °C durante 40 s y una extensión a 72 °C durante 1 min y una extensión final a 72 °C durante 10 min. El producto de esta PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 13.1.

16. Clonación y expresión heteróloga de *PVN2*

16.1. Amplificación del ADNc de *PVN2*

La secuencia codificante de *PVN2* se amplificó por PCR usando como molde el ADNc de las primeras hojas trifoliadas de judía en estado de senescencia avanzado. Para la amplificación se usó la polimerasa incluida en el kit Advantage 2 PCR (Clontech) y los oligonucleótidos pETPVN2.1 y pETPVN2.2 que contenían las secuencias de corte de las enzimas de restricción NcoI y XhoI (Biolab) respectivamente, de modo que introducían dichas secuencias a ambos extremos del fragmento amplificado.

- Oligonucleótidos pETPVN2.1 y pETPVN2.2:



La mezcla de reacción de la PCR estaba compuesta por: 2 μ l de tampón (10x), 0,5 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de cada oligonucleótido 5 μ M, 0,5 μ l de polimerasa Advantage, 2 μ l de ADNc y agua miliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 35 ciclos

compuestos por 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 68 °C durante 40 s y por último una extensión final a 68 °C durante 10 min.

16.2. Clonación de *PVN2* en pSpark y transformación de *E.coli*

El producto de PCR amplificado utilizando los cebadores pETPVN2.1 y pETPVN2.2, con un tamaño aproximado de 885 Kb, se purificó a partir de un gel de agarosa tras su electroforesis, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de Material y Métodos 12.3 y se insertó en el vector de clonación mediante una reacción de ligación. Las ligaciones se llevaron a cabo utilizando el kit de clonación SparkI® (Canvax Biotech). Este kit contiene el plásmido pSpark en forma abierta después de haber sido digerido enzimáticamente mediante la endonucleasa RcoRV 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 PCR en el plásmido gracias al residuo de deoxiadenosina que la polimerasa termoestable que añade a los extremos 3'. La cantidad de inserto y vector necesaria en las ligaciones se calculó mediante la fórmula:

$$\mu\text{l de plásmido} = \frac{3 * \text{tamaño del inserto (pb)} - \text{cantidad de vector } (\mu\text{g})}{\text{Tamaño del vector (pb)}}$$

La ligación del inserto y el plásmido se llevó a cabo mediante la reacción compuesta por: 75 μl de plásmido pSpark, 0,75 μl del fragmento purificado, 1,5 μl tampón de ligación (5x), 0,75 μl de ligasa T4, 75 μl de PEG (10x) y agua miliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 7 μl . La ligación se mantuvo 12 h a 15 °C. Con la construcción resultante de la ligación se transformaron células DH5 α de *E.coli*.

16.3. Selección de los transformantes positivos

Las células transformadas se sembraron en placas que contenían LB sólido suplementado con: ampicilina 0,1 mg/ml, IPTG 0,3 mM y X-gal 0,02 mg/ml, y se incubaron a 37 °C entre 12 y 14 h. Los transformantes positivos se seleccionaron por el color blanco que adquieren como resultado de la interrupción del gen de la β -galactosidasa a causa la inserción del fragmento del ADN exógeno. Este fragmento de ADN impide la síntesis correcta de la enzima que permite a la bacteria hidrolizar el X-gal y producir el compuesto 5-bromo-4-cloro-3-indol por lo que las colonias no transformadas adquieren un color azul. Los transformantes positivos se comprobaron mediante amplificación por PCR y digestión con enzimas de restricción.

16.3.1. Análisis mediante PCR

La presencia del inserto se comprobó mediante reacción de PCR utilizando plásmido aislado de los transformantes positivos y los oligonucleótidos pETPVN2.1 y pETPVN2.2. El resto de componentes de la PCR fueron: 0,2 μ l de polimerasa Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega), 4 μ l de tampón (5x), 1,2 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 0,5 μ l dNTPs 10 mM, y agua miliQ estéril hasta 20 μ l. Las condiciones de esta PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 30 ciclos compuestos por 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 40 s y 68 °C durante 1 min y una extensión final a 72 °C durante 10 min. El producto de esta PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 13.1.

16.3.2. Digestión con enzimas de restricción

Las construcciones se sometieron a una doble digestión con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, cuyas secuencias de corte estaban contenidas en los oligonucleótidos usados para amplificar el inserto de la construcción. La

mezcla de reacción de la digestión estaba compuesta por: 0,1 µl de NcoI y 0,1 µl XhoI, 4 µl tampón TangoTM (2x) (Fermentas), 4 µl de construcción y agua miliQ hasta alcanzar un volumen final de 10 µl. La digestión se llevó a cabo durante 1 h incubando la mezcla a 37 °C. El producto de la digestión se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y tras purificarse se envió a secuenciar utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6.

16.4. Clonación del ADNc de PVN2 en el vector pET30b(+)

El fragmento de ADN purificado en el apartado anterior se clonó en el vector de sobreexpresión pET30b(+) (Novagen) linearizado con las enzimas de restricción NcoI y XhoI. Este plásmido es de bajo número de copias y añade a uno o ambos extremos de la proteína recombinante una cola de histidinas. La reacción de ligación se llevó a cabo a 16 °C durante un período de 12 h. La mezcla de reacción contenía: 2 µl de tampón de ligación (10x), 50 ng de vector pET30b(+) linearizado, 2 µl (unidades Weis) de ADN ligasa T7 (Biotools), y la cantidad adecuada del fragmento de ADN (que se calculó del mismo modo que se describió anteriormente para el vector pSpark), añadiendo agua miliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Con la construcción resultante se transformaron células de BL21 de *E.coli* que se cultivaron en medio LB sólido suplementado con 0,03 mg/ml de kanamicina y se incubaron a 37 °C entre 12 h.

16.5. Selección de transformantes positivos en BL21 (DE3) de *E.coli*

La selección de transformantes positivos para las construcciones derivadas del vector pET30b(+) se realizó sembrando las células transformadas sobre placas que contenían LB-agar suplementado con 0,03 mg/ml de Kanamicina. Estas placas se incubaron a 37 °C durante unas 14 h. Las colonias obtenidas se analizaron por PCR y aquellos clones en los que se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado se secuenciaron según se indica en el apartado 17 con el

objetivo de confirmar que la secuencia introducida era el gen esperado y que carecía de mutaciones.

El fragmento de ADN clonado en el vector se amplificó por PCR utilizando el plásmido aislado de los transformantes positivos y los oligonucleótidos pETPVN2.1 y pETPVN2.2. Los componentes de la PCR fueron: 1 µl de cada oligonucleótido (10 µM), 0,2 µl de polimerasa Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega), 4 µl de tampón (5x), 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl dNTPs 10 mM, y agua miliQ estéril hasta 20 µl. Las condiciones de esta PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización de 95 °C durante 30 s, 58 °C durante 40 s y 68 °C durante 1 min y una extensión final de a 72 °C durante 10 min. El producto de esta PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 13.1.

16.6. Inducción de la expresión de la proteína recombinante

Los transformantes positivos se cultivaron en 25 ml de medio líquido LB de inducción a 37 °C y en agitación constante a 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 595 nm, momento en el que se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM. Para inducir la expresión de la proteína His-PVN2, se ensayaron diferentes concentraciones de IPTG y varias temperaturas de incubación. No obstante, en todos los casos se obtuvieron niveles de inducción muy similares. De forma rutinaria la inducción se realizó a 35 °C durante 2 horas, recogiendo finalmente las bacterias por centrifugación a 2000 g a 4 °C. A continuación se utilizaron para su lisis o se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

17. Secuenciación de ácidos nucleicos

La secuenciación se realizó en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba, utilizando el secuenciador automático ABI PRISM™ 373 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU). Para la secuenciación se utilizó entre 0,2 y 0,4 µg de ADN plasmídico y 3,2 pmoles del oligonucleótido T7 y SP6.

18. Transformación de células competentes

Un volumen de 100 µl de suspensión de células competentes que se descongelaron en hielo instantes previos a la transformación, se añadió el producto de ligación, realizada según se ha descrito en el apartado 16.4. Tras mezclar muy suavemente por pipeteo se incubaron durante 10 min en hielo. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 2 min e inmediatamente se enfriaron manteniéndolas en hielo durante 5 min. El siguiente paso fue añadir 0,9 ml de medio SOC estéril y se incubó a 37 °C durante 60 min sin agitación. Finalmente, el cultivo obtenido se centrifugó a 1.500 g durante 1 min y el precipitado con las células se resuspendió en 100 µl medio SOC. Unos 50 µl se sembraron en una placa de medio LB sólido suplementado con los antibióticos adecuados, y se incubaron a 37 °C durante 12 o 14 h.

- Composición del Medio SOC: una mezcla homogénea entre la Solución I y la Solución II, ajustando finalmente a pH 7.
 - Solución I: NaCl 8,6 mM, bacto-triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l y KCl 2,5 mM esterilizada en el autoclave.
 - Solución II: glucosa 20 mM y MgCl₂ 10 mM esterilizada por filtración en poro de 0,2 µm.

19. Base de datos y programas de análisis y de predicción

19.1. Base de datos

Las bases de datos en las que se realizaron las búsquedas bibliográficas fueron: ISI Web of Knowledge (<http://wokinfo.com>) y NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las bases de datos en las que se buscaron secuencias de genes y proteínas fueron: Phytozome (<http://www.phytozome.net>), NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y Brenda (<http://www.brenda-enzymes.org>), EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>).

19.2. Programas de análisis y de predicción

El análisis de las secuencias, alineamientos y generación de cladogramas se llevó a cabo utilizando los diferentes programas del paquete informático Lasergene (DNASTAR). Para el diseño de los oligonucleótidos se usaron los programas Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) y Oligo6 (Molecular Biology Insight, Inc.). La identificación de posibles motivos funcionales en secuencias de aminoácidos se realizó mediante los programas TargetP Server v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>), SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), Conserved Domain Database and Search Service (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), NetNGlyc1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

III. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

**PURIFICACIÓN DE UNA NUCLEASA EN EJES DE PLÁNTULAS DE
JUDÍA**

1.1 Actividades nucleasa y ribonucleasa en ejes y cotiledones de judía durante la germinación y el desarrollo postgerminativo

Las actividades que catalizan la degradación de ácidos nucleicos se analizaron en ejes y cotiledones de judía durante la germinación y el desarrollo postgerminativo temprano mediante ensayo en gel utilizando ADNmc y ARN como sustratos. Los datos de actividad se normalizaron por cantidad de peso fresco de material y por proteína soluble total. Con ADNmc como sustrato, a partir del 2 DDI y coincidiendo con la emergencia radicular, momento en el que el 50% de las semillas habían germinado, se detectó una única banda con actividad nucleasa en extractos de ejes que se correspondió con una proteína de 37 kDa (Figura 2 A y B). En cotiledones no se detectó ninguna proteína con actividad nucleasa en las mismas condiciones de ensayo. No obstante, al aumentar el tiempo de ensayo se detectó una actividad nucleasa con una masa molecular de 37 kDa en el 5 DDI (Figura 3 C y D).

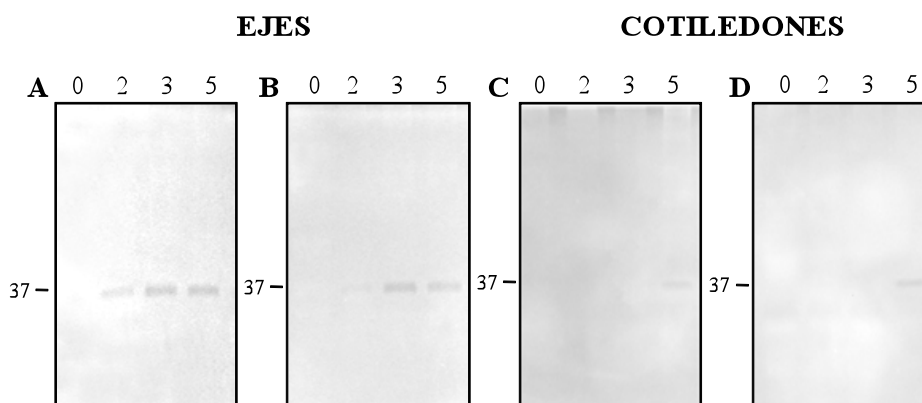


Figura 2. Actividad nucleasa de ejes y cotiledones de judía. La actividad nucleasa se determinó en extractos crudos de ejes (A y B) y de cotiledones (C y D) de plántulas de judía a los días indicados tras el inicio de la imbibición utilizando 5 μ l de extracto (ratio tampón: peso fresco de 4:1) (A y C) o 10 μ g de proteína (B y D) por calle. La actividad se desarrolló con TRIS 50 mM (pH 6,5) durante 10 min para las muestras de ejes y 60 min para cotiledones. La masa molecular (kDa) de la proteína con actividad nucleasa se indica en el margen izquierdo.

Mediante el ensayo de la actividad ribonucleasa en los mismos extractos utilizando ARN como sustrato, se detectó actividad mayoritaria de varias proteínas con masas moleculares aproximadas de 22, 26 y 37 kDa. Esta última podría corresponderse con la proteína con actividad nucleasa descrita anteriormente en el ensayo con ADNmc. Las actividades de estas proteínas incrementaron a partir del 2 DDI, coincidiendo con la emergencia de la radícula (Figura 3). En los extractos de cotiledones se detectaron mayoritariamente las ribonucleasas al 5 DDI.

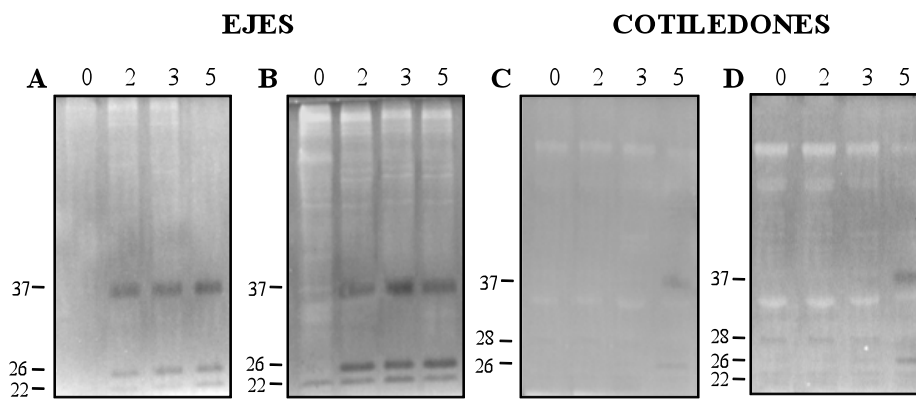


Figura 3. Actividad ribonucleasa en ejes y cotiledones de judía. La actividad ribonucleasa se determinó en los extractos, utilizando las mismas cantidades, tampón de ensayo y tiempo de incubación indicados en la Figura 2. La masa molecular (kDa) de la proteína con actividad nucleasa se indica en el margen izquierdo.

Se determinó el nivel de ureidos en ejes y cotiledones de judía en estos mismos días del desarrollo (Figura 4). Un incremento en la concentración de ureidos se observó a partir del 3 DDI, coincidiendo con el aumento en la actividad nucleasa y actividades ribonucleasas (Figuras 2 y 3).

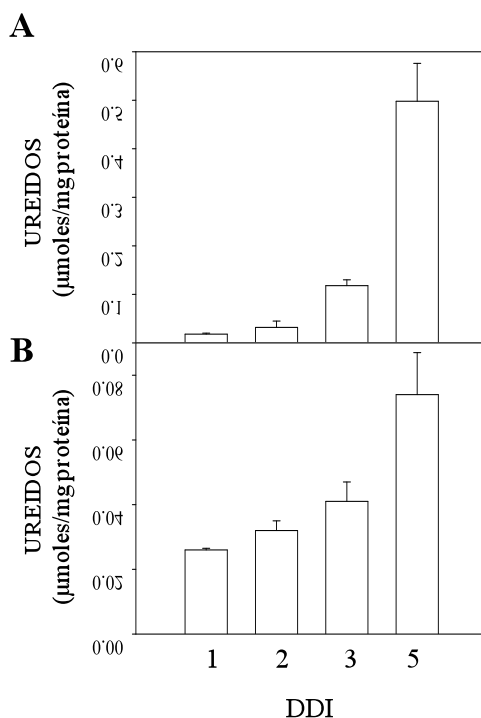


Figura 4. Concentración de ureidos en plántulas de judía. La concentración de ureidos determinada en los mismos extractos de ejes (**A**) y cotiledones (**B**) que se utilizaron en la Figura 2 y 3.

1.2. Actividad nucleasa en plántulas de varias leguminosas

La actividad nucleasa con ADNmc como sustrato se determinó en extractos crudos obtenidos a partir de ejes y cotiledones de plántulas de 5 días de desarrollo de leguminosas ureídicas (judía, soja, soja verde, caupí) y amídicas (garbanzo, lenteja, guisante, haba, titos) (Figura 5 A y B). El número de proteínas con actividad nucleasa, su tamaño y los valores de actividad obtenidos en las diferentes especies fue diverso, tanto en ejes como en cotiledones. En ejes de algunas especies analizadas se detectó una proteína con actividad nucleasa de masa molecular de 37 kDa y que podría tratarse de la misma detectada en judía, donde mostró además, el mayor nivel de actividad (Figura 5). Los valores de actividad nucleasa no siguieron una relación con respecto a la concentración de ureidos (Figura 5 C y D).

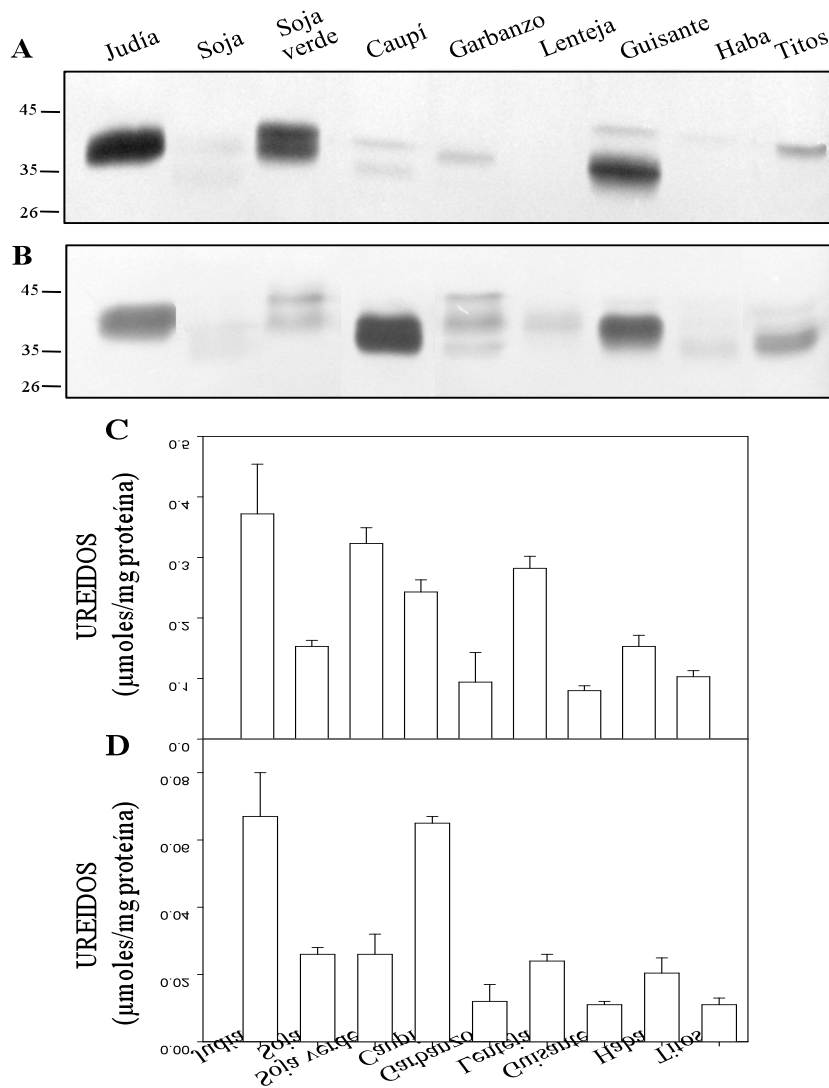


Figura 5. Actividad nucleasa y concentración de ureidos en plántulas de leguminosas. La actividad nucleasa se determinó en extractos crudos de ejes (A) y cotiledones (B) de las plántulas indicadas a los 5 DDI. La actividad se normalizó frente a 15 μg de proteína soluble total en cada carril y el tiempo de desarrollo de la actividad fue de 20 min en ejes y 60 min en cotiledones. La posición de algunos de los marcadores de tamaño (kDa) se indica la izquierda de la figura. Se analizó la concentración de ureidos en los mismos extractos de ejes (C) y cotiledones (D) que se utilizaron en la Figura 3.

1.3. Caracterización de la actividad nucleasa de 37 kDa de ejes de judía

Las principales características enzimáticas de la actividad nucleasa de 37 kDa de judía se determinaron utilizando extractos crudos obtenidos a partir de ejes en desarrollo a los 3 días tras el inicio de la imbibición. A menos que se indique lo contrario, los ensayos se realizaron según se describe en el apartado 10 de Material y Métodos, cargando 10 o 15 μg de proteína junto con el tampón de carga que contenía SDS en ausencia de agentes reductores. El extracto crudo con el tampón de carga se incubó a 65 °C durante 10 minutos, antes de cargar la muestra en el gel para favorecer la migración de las proteínas durante la electroforesis.

1.3.1. Especificidad de sustrato

La especificidad de sustrato se determinó utilizando como sustratos ADN_{mc}, ADN_{bc} y ARN a una concentración final de 1 mg/ml (Figura 6). En estas condiciones de ensayo la nucleasa de 37 kDa sólo utilizó como sustratos los ácidos nucleicos de cadena simple, ADN_{mc} y ARN, mostrando mayor afinidad por ARN. No se detectó actividad con ADN_{bc} como sustrato.

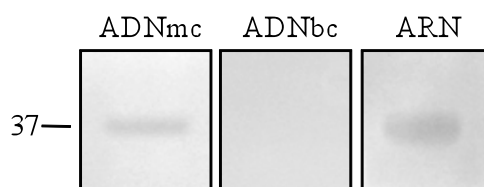


Figura 6. Especificidad de sustrato de la actividad nucleasa de ejes de judía. El ensayo de la actividad nucleasa se realizó con los sustratos indicados a una concentración final de 1 mg/ml con extractos obtenidos de ejes de 3 DDI. En cada carril se cargó 5 μl de extracto crudo (ratio tampón: peso fresco de 4:1) y el tiempo de desarrollo de la actividad fue de 15 min. La masa molecular (kDa) de la proteína con actividad nucleasa se indica en el margen izquierdo.

1.3.2. Temperatura y pH óptimo

La temperatura óptima del ensayo de la actividad nucleasa fue de 50 °C (Figura 7.A). A temperaturas superiores se produjeron alteraciones en la integridad del gel de acrilamida. En los ensayos de actividad realizados a distintos valores de pH (4,5 a 8,5) sólo se detectó la actividad nucleasa con masa molecular de 37 kDa. La máxima actividad se obtuvo a valores de pH de 5,5 y 6,5, lo que indica que es una nucleasa ácida (Figura 7.B).

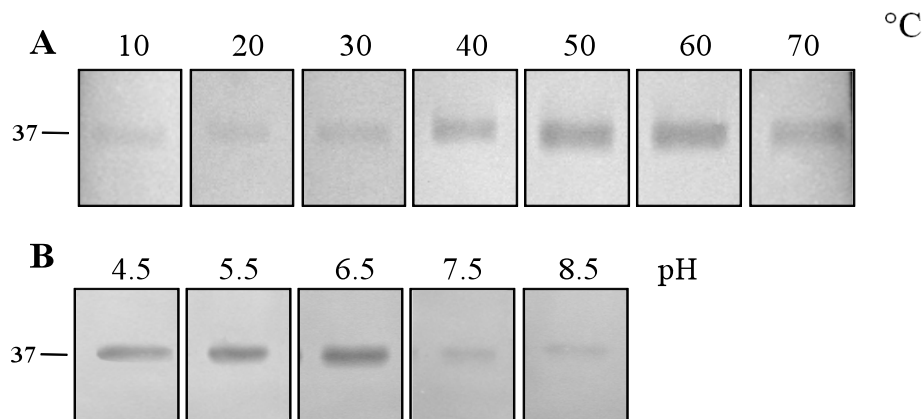


Figura 7. Temperatura y pH óptimo de la actividad nucleasa de ejes de judía. La actividad nucleasa con ADNmc como sustrato se desarrolló a las temperaturas indicadas (A) y a los pH (B) indicados.

1.3.4. Efecto del EDTA y de cationes divalentes

La actividad nucleasa se determinó en presencia de diferentes cationes tanto a pH ácido como neutro (Figura 8). La inclusión de los cationes al sistema de ensayo no indujo la actividad de otras nucleasas y en todas las condiciones se detectó una única actividad con masa molecular de 37 kDa, mostrando un ligero incremento en presencia de Zn^{2+} (Figura 8.A).

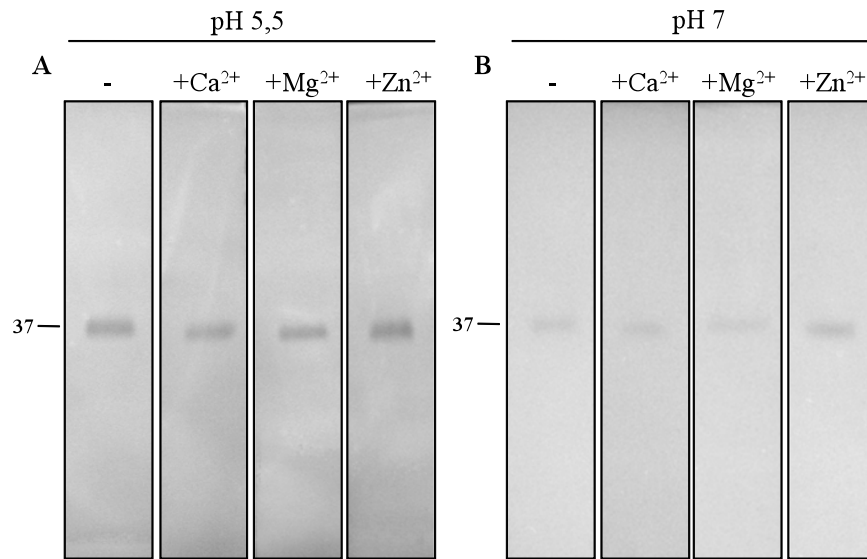


Figura 8. Actividad nucleasa en presencia de cationes. La actividad nucleasa se desarrolló en acetato 50 mM (pH 5,5) (A) y TES 50 mM (pH 7) (B), en ausencia (-) y presencia de los cationes indicados a una concentración final de 0,1 mM.

El tratamiento con el agente quelante EDTA produjo una inhibición total de la actividad a concentraciones superiores a 0,5 mM (Figura 9.A). Por tanto, esta enzima precisa de un cofactor para desarrollar su actividad. Únicamente la inclusión de Zn²⁺ consiguió revertir de forma específica la inhibición causada por el EDTA (Figura 9.B). Por este motivo, se estudió el efecto de la inclusión de distintas concentraciones de Zn²⁺ en el ensayo (Figura 9.C). La inclusión de Zn²⁺ a concentraciones hasta 1 mM no afectó a la actividad, mientras que se observó inhibición a concentraciones superiores (Figura 9.C).

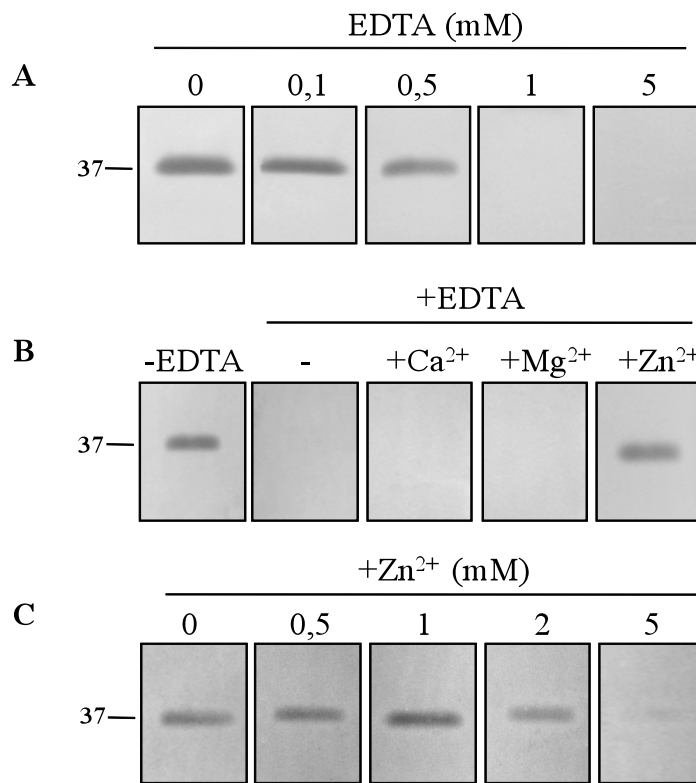


Figura 9. Efecto de EDTA y de los cationes divalentes en la actividad nucleasa de judía. La actividad nucleasa se determinó a las concentraciones de EDTA indicadas (A). La actividad nucleasa se determinó en ausencia (-EDTA), o en presencia de 1mM de EDTA (+EDTA) y en ausencia (-) o en presencia de los cationes indicados (5 mM) (B). La actividad se determinó en presencia de Zn²⁺ a las concentraciones indicadas (C).

1.3.5. Efecto de la concanavalina-A

Con el objetivo de determinar si la nucleasa de 37 kDa es una glicoproteína se incubó el extracto con la proteína concanavalina-A previamente a la determinación de la actividad. Este tratamiento dio lugar a la pérdida total de la actividad indicando que la nucleasa de 37 kDa es una glicoproteína (Figura 10).

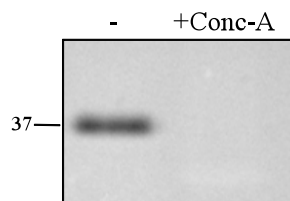


Figura 10. Efecto de la concanavalina-A en la nucleasa de judía. Extracto crudo se incubó en ausencia (-) o en presencia de concanavalina-A (+Conc-A) a temperatura ambiente durante 60 min y posteriormente se desarrolló la actividad nucleasa.

1.3.6. Efecto del fosfato y pirofosfato

La actividad nucleasa se inhibió por la inclusión en el tampón de ensayo de concentraciones superiores a 100 μM de Pi o de PPi (Figura 11).

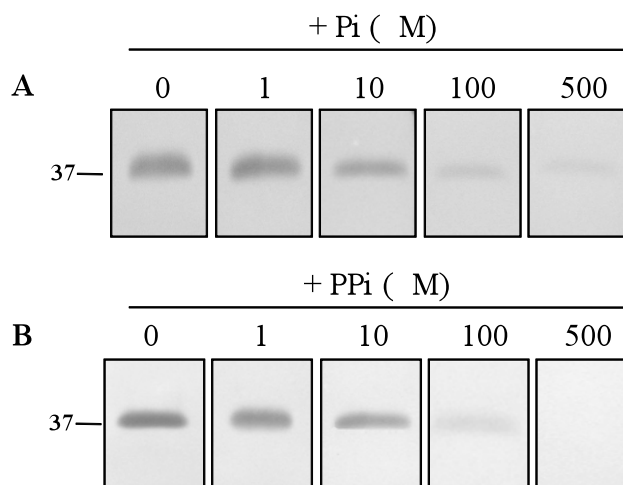


Figura 11 Efecto del Pi y PPi en la actividad nucleasa de judía. El ensayo de la actividad nucleasa se realizó en presencia de Pi (A) y PPi (B) a las concentraciones finales indicadas.

1.4. Purificación de la nucleasa de ejes de judía

La proteína de 37 kDa con actividad nucleasa, determinada en extractos crudos obtenidos a partir de ejes en desarrollo de judía, se purificó hasta homogeneidad electroforética utilizando como material ejes en desarrollo de judía de 5 días mediante el procedimiento que se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Purificación de la actividad nucleasa de ejes de *Phaseolus vulgaris*. El extracto crudo se obtuvo a partir de 25 gramos de peso fresco de ejes de plántulas judía de 5 DDI.

	Actividad total (KU)	Proteína total (mg)	Actividad específica (KU/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	210,7	233,3	0,9	100	1
Sulfato amónico	70,9	7,7	9,2	34	10
Tratamiento térmico	66,6	3	22,2	31	25
DEAE	38,0	0,448	84,8	18	94
Concanavalina-A	23,4	0,035	668,8	11	743

Durante todo el proceso se obtuvo un único pico de actividad nucleasa en los diferentes pasos de purificación. El proceso de purificación completo alcanzó un factor de purificación final de 743 y un rendimiento del 11% (Tabla 2). El primer paso de purificación consistió en una precipitación fraccionada con sulfato amónico con el que se eliminó el 96% de la proteína total y se consiguió un factor de purificación de 10. La preparación enzimática resultante se dializó y, aprovechando su estabilidad térmica, se sometió a un tratamiento térmico en presencia de Zn^{2+} . A continuación, se realizó una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. La elución de la proteína con actividad nucleasa se llevó a cabo con una concentración superior a 400 mM de NaCl (Figura 12). El último paso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad con concanavalina-A y la actividad nucleasa se eluyó a partir de una concentración aproximada de 350 mM de metil α -D-manopiranosido (Figura 13).

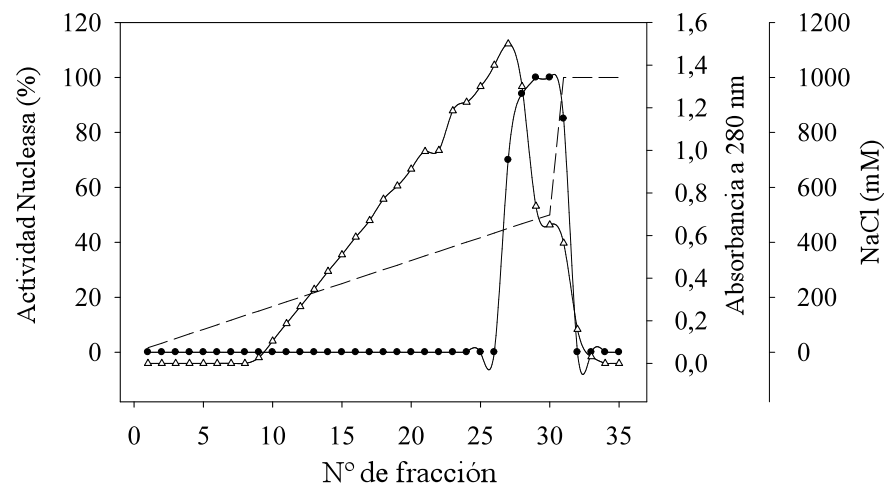


Figura 12. Cromatografía de intercambio iónico. La preparación procedente del tratamiento térmico se cargó en una columna de intercambio iónico DEAE-Sephacel. La cromatografía se desarrolló a un flujo de 1 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,5 M (línea discontinua). En cada fracción se analizó la actividad nucleasa *in vitro* (línea con círculos negros) y el contenido en proteínas (línea con triángulos). El 100% de la actividad se corresponde con 7,54 KU/ml.

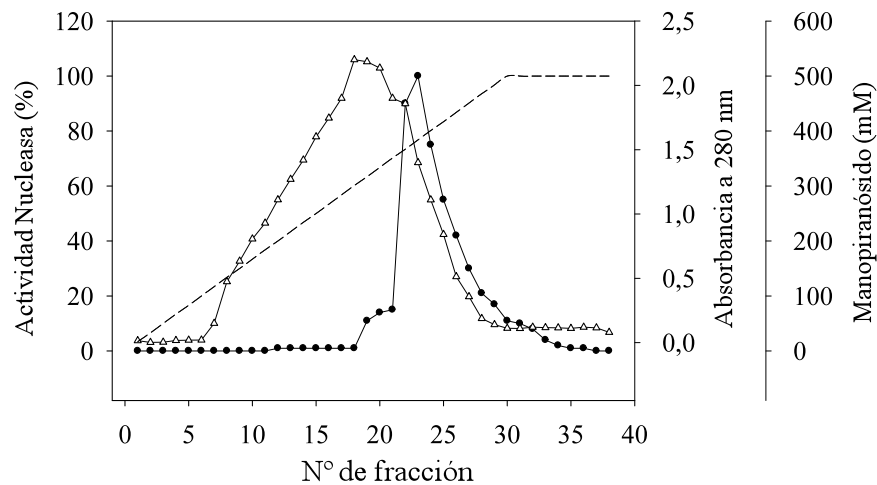


Figura 13. Cromatografía de afinidad en concanavalina-A. La preparación procedente de la cromatografía en DEAE-Sephacel se cargó en una columna de afinidad en concanavalina-A. La cromatografía se desarrolló a un flujo de 1 ml/min y se recogieron fracciones de 1 ml. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de metil α -D-manopiranosido de 0 a 0,5 M (línea discontinua). En cada fracción se analizó la actividad nucleasa *in vitro* (línea de círculos negros) y el contenido en proteínas (línea con triángulos). El 100% de la actividad se corresponde con 8.3 KU/ml.

La proteína purificada mostró actividad nucleasa con una masa molecular de 37 kDa (Figura 14.A). Cuando se sometió a SDS-PAGE, en ausencia de agentes reductores y calor y, se tiñó con plata se obtuvo una única proteína con la misma masa molecular (Figura 14.B). No obstante, cuando la proteína purificada se trató con agentes reductores y calor, antes de separar mediante SDS-PAGE, la masa molecular de la banda con actividad (Figura 14.C) así como la de la proteína teñida con plata (Figura 14.D) cambió a 47 kDa.

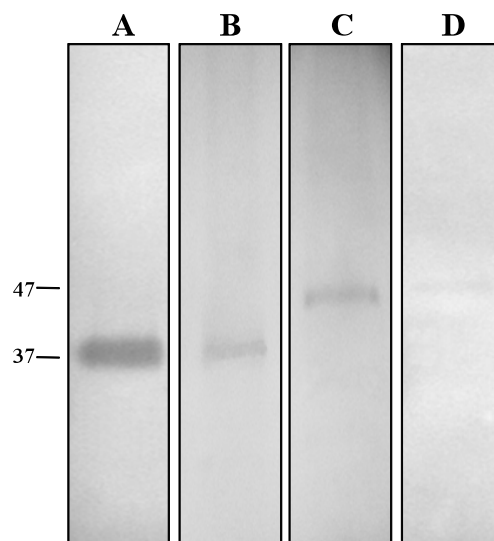


Figura 14. Análisis mediante electroforesis de la nucleasa purificada. La proteína purificada se mezcló con tampón de carga que contenía SDS y en ausencia de DTT. Una parte alícuota de ésta se sometió a SDS-PAGE determinándose la actividad nucleasa (A) y otra parte se resolvió en un gel que se tiñó con plata (B). La proteína purificada se mezcló con tampón de carga que contenía SDS, DTT, se incubó durante 5 min antes calor antes del someter a SDS-PAGE, posteriormente una parte alícuota de ésta se sometió a SDS-PAGE determinándose la actividad nucleasa (C) y otra parte se resolvió en un gel que se tiñó con plata (D). Las masas moleculares (kDa) de la proteína se muestran en la parte izquierda de la figura.

1.5. Principales características de la nucleasa purificada

Cuando la actividad nucleasa se determinó mediante el ensayo *in vitro* utilizando distintas concentraciones de ADNmc se obtuvo una cinética hiperbólica (Figura 15). La actividad máxima se obtuvo a una concentración en la mezcla de ensayo de 1,0 mg/ml (Figura 15.A). La actividad mostró un pH

óptimo de 5,5 (Figura 15.B) y una temperatura óptima de 70 °C (Figura 15.C). La actividad enzimática fue resistente a los tratamientos con calor y la enzima mantuvo su actividad tras 30 minutos de incubación a 65 °C. El tratamiento con EDTA de la enzima pura inhibió su actividad enzimática sugiriendo que los cationes son esenciales para la actividad (Figura 15.D). La adición de Ca^{2+} , Mg^{2+} o Mn^{2+} no afectó a la actividad inhibida por EDTA, mientras que la inclusión de Zn^{2+} logró revertirla a un valor del 75% del inicial (Figura 15.D).

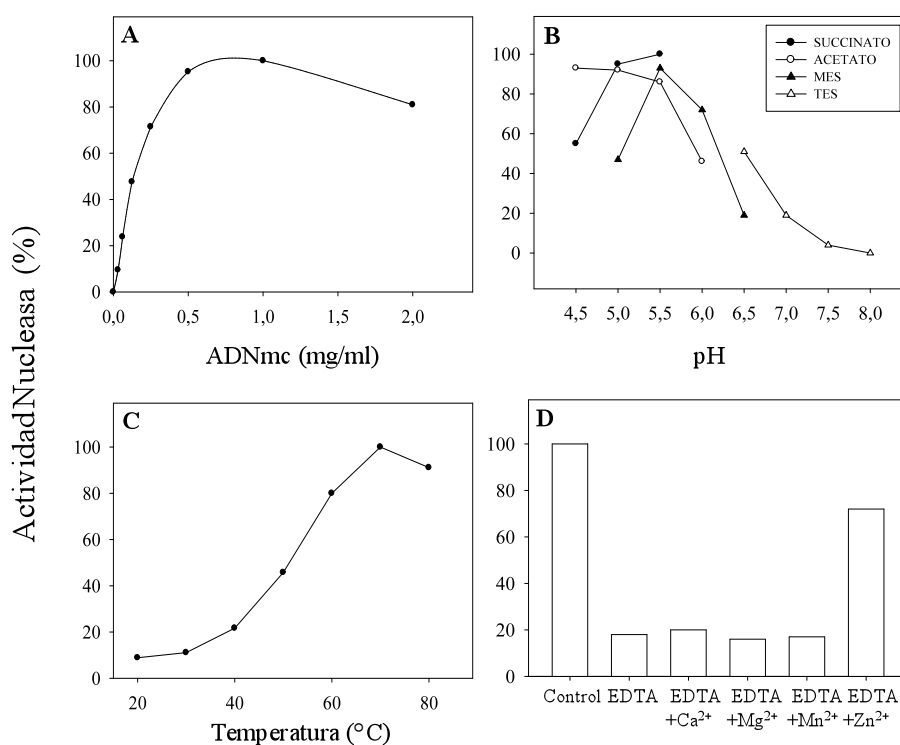


Figura 15. Principales características de la nucleasa purificada. La actividad nucleasa *in vitro* se determinó a las concentraciones de ADNmc indicadas (A). El pH óptimo se determinó mediante el ensayo de la actividad en presencia de los tampones (50 mM) indicados y a los valores de pH indicados (B). La temperatura óptima se determinó mediante el ensayo de la actividad a las temperaturas indicadas (C). El efecto del EDTA y varios metales en actividad se determinó tras tratar la enzima pura con 3,3 mM de EDTA durante 90 min a temperatura ambiente e incubando y determinando la actividad posteriormente con los metales indicados a una concentración final de 0,1 mM (D). Para todas las determinaciones la desviación estándar fue menos del 10%.

CAPÍTULO 2

**IDENTIFICACIÓN DE LA NUCLEASA PURIFICADA.
ANÁLISIS DE LA FAMILIA S1/P1 EN JUDÍA**

2.1. Identificación de la proteína purificada de 37 kDa de ejes mediante secuenciación *de novo*

La proteína de 37 kDa purificada a partir de ejes de judía se sometió a electroforesis en ausencia de condiciones reductoras y sin tratamiento térmico previo a la carga en el gel. Tras separarse mediante SDS-PAGE se aisló del gel y se analizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Los péptidos obtenidos, no permitieron identificar ninguna proteína en las bases de datos disponibles. Por tanto, algunos péptidos se sometieron a una segunda digestión y secuenciación *de novo* y se obtuvieron cuatro secuencias peptídicas (Figura 16). Estas secuencias permitieron la identificación de una nucleasa tipo S1 de *Glycine max* (XP_003516835.1) en la base de datos. Esta proteína está constituida por 295 aminoácidos y contiene 32 aminoácidos de los 60 identificados en los cuatro péptidos obtenidos mediante secuenciación *de novo*, lo que supone una cobertura del 10,8% del gen que la codifica.

Durante el desarrollo de este trabajo se hizo disponible el genoma completo de judía y mediante la búsqueda en la base de datos con los cuatro péptidos (www.Phytozome.org) se identificó el gen Phvul.003G030200. El transcrito que se predice para este gen contiene todos los aminoácidos identificados en los péptidos (Figura 17). Este gen está situado en el cromosoma 3 y se le asignó el nombre *PVNI*. Además, la base de datos predice la posible existencia de 3 transcritos distintos para dicho gen: Phvul.003G030200.1, Phvul.003G030200.2 y Phvul.003G030200.3, a los que se les denominó respectivamente: PVN1.1, PVN1.2 y PVN1.3.

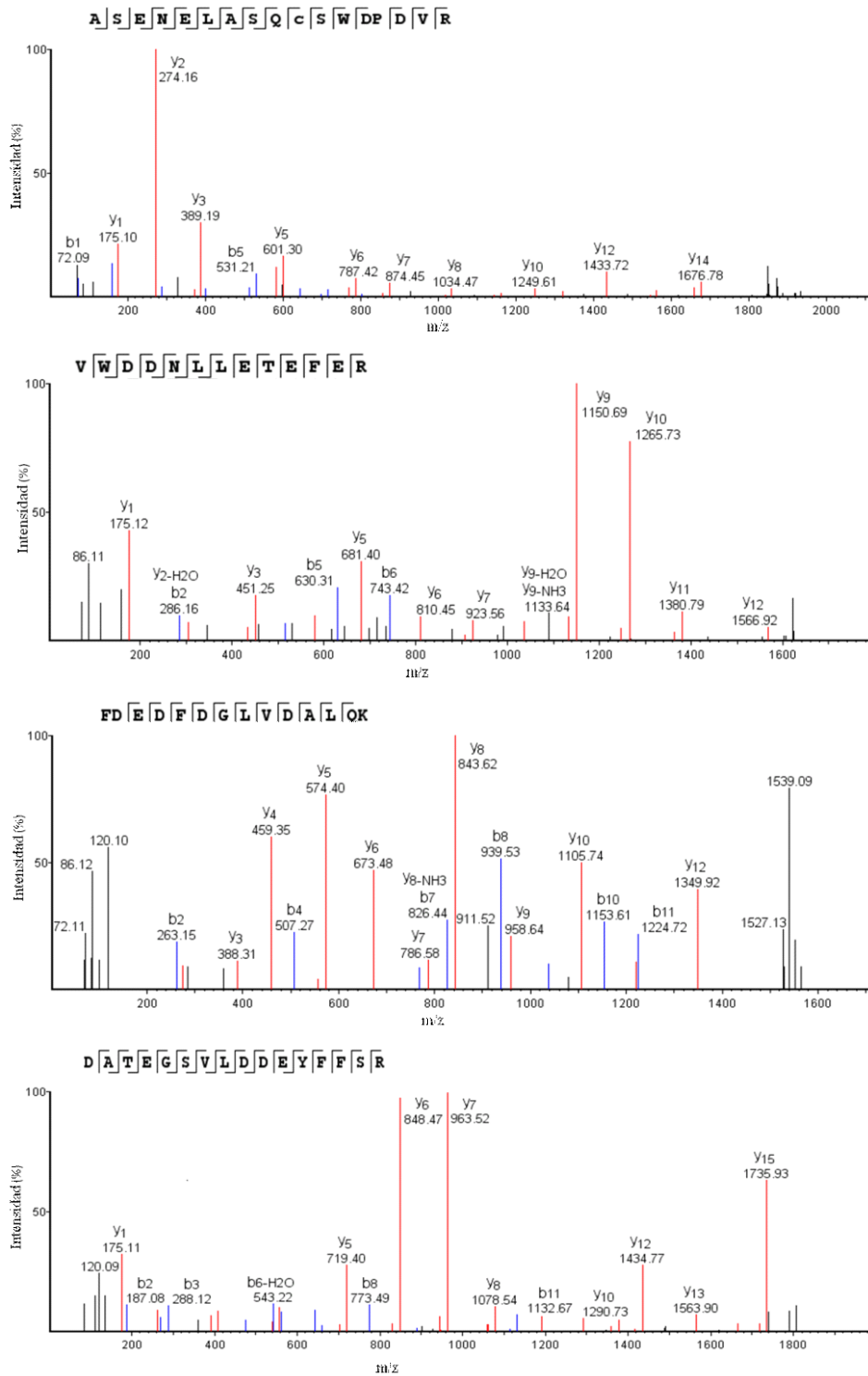


Figura 16. Espectro de la identificación de las secuencias mediante secuenciación *de novo*. En los cuatro espectros obtenidos se muestra la intensidad de señal emitida para cada fragmento y las secuencias deducidas para cada péptido.

2.2. Análisis de los transcritos del gen *PVNI*

El alineamiento de las proteínas deducidas para los tres posibles transcritos del gen *PVNI* con los péptidos obtenidos mediante la secuenciación *de novo* de la proteína purificada sugirió que el transcrito PVN1.1 codificaría dicha proteína, al ser el único que contiene todos los aminoácidos de los péptidos (Figura 17).

```

PVN1.1  MGSYRIEIVVIVSLMVLVLPNAKGWKGKDGHAIVCKIGQGRLSAAAEAVSKLLPRSAEENELASQCSWPDDVR 71
PVN1.2  MGSYRIEIVVIVSLMVLVLPNAKGWKGKDGHAIVCKIGQGRLSAAAEAVSKLLPRSAEENELASQCSWPDDVR 71
PVN1.3  MGSYRIEIVVIVSLMVLVLPNAKGWKGKDGHAIVCKIGQGRLSAAAEAVSKLLPRSAEENELASQCSWPDDVR 71
                                             AENELASQCSWPDDVR

PVN1.1  KVIPWSSALHFADTADSVCSYDHTDCVDQRTGVKNRCVVAISNYTNQLLQYGYTQSNYNLTEALLFLS 142
PVN1.2  KVIPWSSALHFADTADSVCSYDHTDCVDQRTGVKNRCVVAISNYTNQLLQYGYTQSNYNLTEALLFLS 142
PVN1.3  KVIPWSSALHFADTADSVCSYDHTDCVDQRTGVKNRCVVAISNYTNQLLQYGYTQSNYNLTEALLFLS 142

PVN1.1  HFIGDIHQPLHCGFVSDLGGNTINVLWYNTTQKLHRVWDDNI IETEFERFDEDFDGLVDAIOKNITEHCSN 213
PVN1.2  HFIGDIHQPLHCGFVSDLGGNTINVLWYNTTQKLHRVWDDNI IETEFERFDEDFDGLVDAIOKNITKV--- 210
PVN1.3  HFIGDIHQPLHCGFVSDLGGNTINVLWYNTTQKLHRVWDDNI IETEFERFDEDFDGLVDAIOKNIT----- 208
                                             VWDDNI IETEFERFDEDFDGLVDAI

PVN1.1  NDISCPALYASESAEDSCKWAYKDATEGSVLDDEYFLSRYFIVNLRLAQGGVRLAATLNRIFNKYYAAVI 283
PVN1.2  -----WA-----NEVED----- 217
PVN1.3  -----IC-----I----- 211
                                             DATEGSVLDDEYFLSR

```

Figura 17. Alineamiento de la secuencias aminoacídicas deducidas para PVN1.1, PVN1.2, PVN1.3 con las secuencias peptídicas obtenidas mediante secuenciación *de novo*. El alineamiento se realizó por el método Clustal W del programa MegAlign. Los aminoácidos de los transcritos que coinciden con las secuencias peptídicas se sombreen en negro.

Según la información disponible en la base de datos (www.Phytozome.org) los tres transcritos del gen *PVNI* tienen tamaños distintos y codificarían tres proteínas de tamaños diferentes. En la Tabla 3 se indica el número de nucleótidos de las distintas secuencias, así como la masa molecular de la proteína correspondiente.

Tabla 3. Tamaño de los transcritos del gen *PVNI* y de las posibles proteínas. En la tabla se indican el número de nucleótidos (n) que compone cada secuencia y masa molecular de la proteína (kDa)

	Transcrito (n)	Región codificante (n)	Proteína (kDa)
PVN1.1	852	852	29,9
PVN1.2	995	654	24,3
PVN1.3	927	636	23,5

El gen *PVNI* contiene 3667 nucleótidos en su secuencia y estaría compuesto de 9 exones. En la Figura 18 se esquematiza el origen de los distintos transcritos del gen por posible splicing alternativo. El transcrito PVN1.1 presenta los 9 exones (I al IX) y cuya traducción completa origina una secuencia peptídica de 29,9 kDa. El transcrito PVN1.2 presenta los 6 primeros exones (I al VI) y parte del séptimo (VII) dando lugar a un péptido de 24,3 kDa. El transcrito PVN1.3 presenta 6 exones (I al VI) y una pequeña parte del séptimo exón (VII) y daría lugar a un péptido de 23,5 kDa (Figura 18).

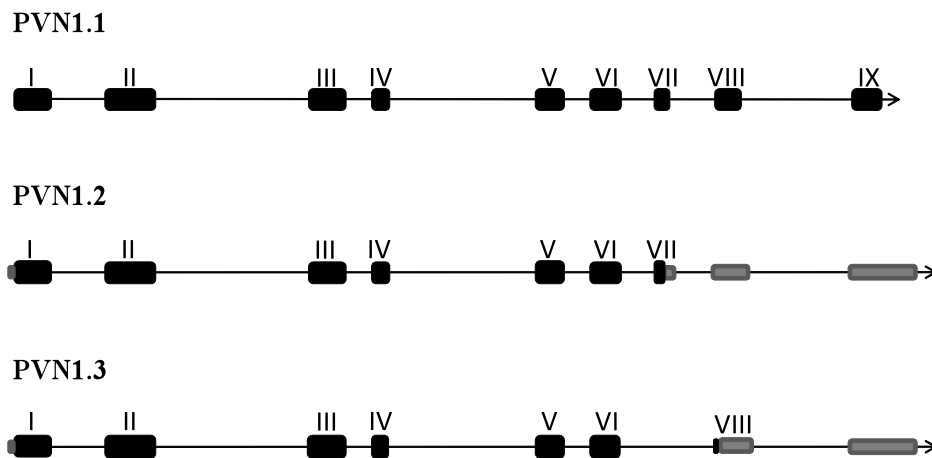


Figura 18. Esquema de los exones que componen los posibles transcritos del gen *PVNI*. Los diferentes exones se enumeran en la parte superior con números romanos. Los exones transcritos se representan mediante rectángulos, mostrando en negro los que se traducen y en gris lo que no lo hacen.

A partir de las secuencias de los tres transcritos se diseñaron 4 oligonucleótidos que permitieran, por los tamaños de los fragmentos originados mediante amplificación por PCR, la discriminación de transcrito presente en una muestra. El tamaño de los productos de PCR esperados para cada pareja de cebadores y para cada transcrito, cuando se utiliza como ADNc ejes de plántulas de judía, se esquematiza en la Tabla 4.

Tabla 4. Tamaño de los productos esperados por PCR (pb) con las diferentes combinaciones de cebadores y para cada transcrito. El guión indica que la pareja de cebadores no amplifica ese transcrito.

Cebadores	PVN.1	PVN1.2	PVN1.3
PVN1.D-PVN1.R	549	579	511
PVN1.D-PVN1.2-3.R	-	606	538
PVN1.D-PVN1.2.R	-	350	-

Se llevaron a cabo PCRs utilizando un oligonucleótido directo (PVN1.D) y tres reversos (PVN1.R, PVN1.2.R y PVN1.2-3.R) y utilizando como molde ADN copia obtenido a partir de ARN de ejes de judía (Figura 19). Cuando se utilizaron los oligonucleótidos PVN1.D y PVN1.R, diseñados a partir de los extremos de las secuencias de los tres transcritos, se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 579 pb. Cuando se realizó una segunda PCR utilizando los oligonucleótidos PVN1.D y PVN1.2-3.R, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 606 pb. Por último, cuando se realizó una PCR con PVN1.D y PVN1.2.R, se obtuvo un fragmento de aproximadamente de 350 pb. Los resultados de estas PCRs indicaron que el transcrito que se está expresando en ejes en desarrollo es PVN1.2. Sin embargo, esto estaba en contradicción con el hecho de que el péptido codificado por dicho transcrito no contiene los péptidos obtenidos por secuenciación *de novo* a partir de la proteína purificada de ejes en desarrollo.

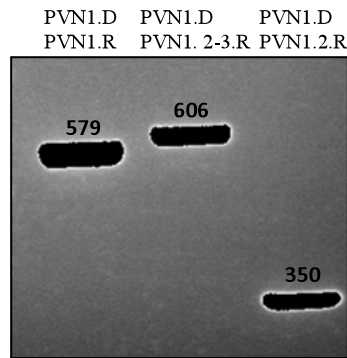


Figura 19. Escrutinio mediante PCR del transcrito PVN1 en ejes de judía. Productos de PCR originados utilizando como molde ADN copia de ejes de 4 DDI y utilizando las parejas de oligonucleótidos indicadas en la figura. El tamaño (pb) de cada producto se indica sobre cada banda. El programa de PCR fue de 30 ciclos.

2.3. Análisis de la secuencia del gen *PVN1*

Para confirmar que PVN1.2 es el transcrito a partir del cual se sintetiza la proteína purificada en ejes de judía, se clonó el fragmento de 579 pb amplificado por PCR con los oligonucleótidos PVN1.D y PVN1.R. El alineamiento de la secuencia obtenida a partir de dicho producto y los diferentes transcritos confirmó que PVN1.2 codificaría la nucleasa de ejes (Figura 20). No obstante, se encontraron algunas diferencias en varios nucleótidos que no implican cambios en la proteína final, a excepción del situado en la posición 653 de PVN1.2. En esta posición se introduce un codón de fin de lectura presente en la secuencia de PVN1.2 y que originaría una proteína truncada (Figura 20). La sustitución de éste nucleótido mediante el programa SeqBuilder originó una nueva proteína (PVN1.2*) que contenía todos los péptidos obtenidos mediante la secuenciación *de novo* de la proteína purificada, que tendría los 9 exones indicados en la Figura 18 y que daría lugar a una proteína con una masa molecular de 32 kDa.

```

PNV1.1 ACATAATTGAAACAGAATTCGAAAGATTTGATGAGGATTTTGACGGCTTGGTTGATGCAATTCAAAAGAA 617
PVN1.2 ACATAATTGAAACAGAATTCGAAAGATTTGATGAGGATTTTGACGGCTTGGTTGATGCAATTCAAAAGAA 630
PVN1.3 ACATAATTGAAACAGAATTCGAAAGATTTGATGAGGATTTTGACGGCTTGGTTGATGCAATTCAAAAGAA 630
CLONADA ACATAATTGAAACAGAATTCGAAAGATTTGATGAGGATTTTGACGGCTTGGTTGATGCAATTCAAAAGAA 627

PNV1.1 TATTACG-----GAGCACTGCAGTAATAATGACATATCATGCCCA 657
PVN1.2 TATTACGAAAGTATGGGCTAATGAAGTAGAAGATTTAGGAGCACTGCAGTAATAATGACATATCATGCCCA 700
PVN1.3 TATTACGA-----TGGGAGCACTGCAGTAATAATGACATATCATGCCCA 638
CLONADA TATTACGAAAGTATGGGCTAATGAAGTAGAAGATTTGGGAGCACTGCAGTAATAATGACATATCATGCCCA 697

PNV1.1 GCTTTATATGCATCTGAAAGTGCAGGAAAGATTCTGTAAATGGGCCTATAAAGATGCCACTGAAGGTTTCAG 727
PVN1.2 GCTTTATATGCATCTGAAAGTGCAGGAAAGATTCTGTAAATGGGCCTATAAAGATGCCACTGAAGGTTTCAG 770
PVN1.3 -----TATGCATCTGAAAGTGCAGGAAAGATTCTGTAAATGGGCCTATAAAGATGCCACTGAAGGTTTCAG 702
CLONADA GCTTTATATGCATCTGAAAGTGCAGGAAAGATTCTGTAAATGGGCCTATAAAGATGCCACTGAAGGTTTCAG 767

PNV1.1 TATTAGATGATGAATACTTCTTATCTCGTTATCCGATAGTGAATTTGCGGTTAGCTCAAGGAGGAGTTTCG 797
PVN1.2 TATTAGATGATGAATACTTCTTATCTCGTTATCCGATAGTGAATTTGCGGTTAGCTCAAGGAGGAGTTTCG 840
PVN1.3 TATTAGATGATGAATACTTCTTATCTCGTTATCCGATAGTGAATTTGCGGTTAGCTCAAGGAGGAGTTTCG 772
CLONADA TACTAGATGATGAATATTTCTTCTCTCGTTTCCGATAGTGAATTTGCGGTTAGCTCAAGGAGGAGTTTCG 837

PNV1.1 ATTGGCTGCAACTCTTAATCGTATCTTTAACACAAAGTATGCAGCGGTTATTTAG 852
PVN1.2 ATTGGCTGCAACTCTTAATCGTATCTTTAACACAAAGTATGCAGCGGTTATTTAGTGTGATTGGATCATG 910
PVN1.3 ATTGGCTGCAACTCTTAATCGTATCTTTAACACAAAGTATGCAGCGGTTATTTAGTGTGATTGGATCATG 842
CLONADA ATTGGCTGCAACTCTTAATCGTATCTTTAACACAAAGTATGCAGCGGTTATTTAGCTCGA----- 897

```

Figura 20. Alineamiento de un fragmento de los transcritos de PNV1.1, PNV1.2 y PNV1.3 y la secuencia clonada a partir de ejes de judía (CLONADA). El alineamiento se realizó por el método Clustal W del programa MegAlign. Los nucleótidos sombreados en negro indican el codón de fin de lectura de cada transcrito y en gris el cambio que elimina el codón de fin de lectura.

El gen *PVNI* pertenece a la familia S1/P1 de las nucleasas por contener un dominio PF02265 (www.Phytozome.org). Los miembros de esta familia codifican proteínas con actividad endonucleasa (dominio GO: 004519), actividad hidrolasa sobre enlaces éster (GO: 0016788) y poseen capacidad para degradar ácidos nucleicos (dominio GO: 0006308). Además, presentan sitios de reconocimiento y unión a ácidos nucleicos (dominio GO: 0003676). El análisis de *PVNI*, mediante el programa Conserved Domain Database and Search Service de la base de datos NCBI, permitió identificar dominios altamente conservados característicos de la familia S1/P1 nucleasas y de la superfamilia de las ZnPC-S1/P1. Por otro lado, el análisis de la secuencia aminoacídica deducida para el transcrito PVN1.2 secuenciado mediante el programa SeqBuilder predijo una proteína de masa molecular de 32 kDa y un punto isoeléctrico de 4,9. El programa Signal P 4.0 con los algoritmos de la herramienta TargetP 1.1 predijo la presencia de un péptido señal de secreción a

retículo endoplásmico, con un probable sitio de rotura entre los aminoácidos de 23 y 24 en la región N-terminal.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PNV1 frente a las de otros miembros de la familia S1/P1 reveló una gran identidad entre dichas secuencias (Figura 21). Todas las secuencias tienen conservados los nueve aminoácidos caracterizados en P1 e involucrados en la unión del ión Zn^{2+} . La secuencia de aminoácidos de PVN1 también contiene los cuatro residuos cisteína que participan en la formación de los dos puentes disulfuro responsables de la estructura terciaria en P1 y S1 (Figura 21). Los aminoácidos que sufren glicosilación, así como aquellos que constituyen sitios activos en las nucleasas S1/P1, también se encuentran altamente conservados en PVN1 (Figura 21). De las dos secuencias de unión descritas en P1, las secuencias de plantas sólo tienen el primero aunque con ciertas diferencias, mientras que el segundo no se encuentra en ninguna de las secuencias (Figura 21).

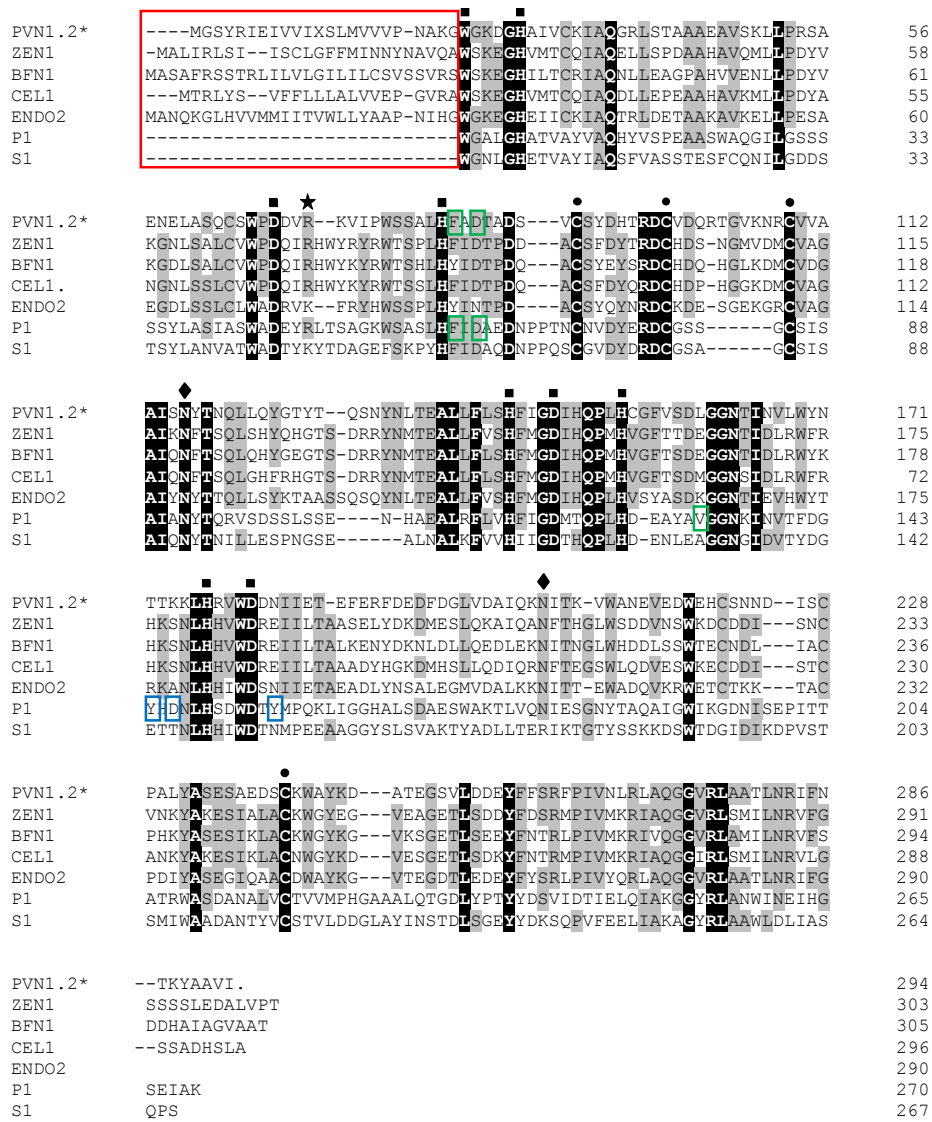


Figura 21. Alineamiento de la secuencia de PN1.2* frente a otras secuencias de nucleasas S1/P1. El alineamiento se realizó por el método Clustal W del programa MegAlign con las secuencias aminoácidas de PN1.2* de *Phaseolus vulgaris*, de *Arabidopsis thaliana* (BFN1 y ENDO2), *Zinnia elegans* (ZEN1 (BAA28948)), *Apium graveolens* (CEL1 (AF237958.1)), *Penicillium citrinum* (P1 (P24289)) y *Aspergillus oryzae* (S1 (P24021)). En la figura se indican: los aminoácidos conservados en todas las secuencias (sombreado negro), los conservados al menos en 4 de las secuencias (sombreado gris), los residuos que componen los sitios de unión de los ligandos Zn1, Zn2 y Zn3 en P1 (cuadros negros), los residuos involucrados en la formación de puentes disulfuro en la nucleasa P1 (círculos negros), los péptidos señal (marco rojo), los residuos implicados en sitios de glicosilación en P1 (diamantes) los aminoácidos involucrados en los sitios de unión a ácidos nucleicos 1 (marco verde) y 2 (marco azul) descritos en P1.

2.4. Identificación y análisis de la familia S1/P1 nucleasas en judía

Además de *PVN1*, en la base de datos Phytozome se identificaron otros cuatro genes pertenecientes a la familia S1/P1 nucleasas en judía: Phvul.003G030500, Phvul.002G223100, Phvul.006G190700 y Phvul.007G028400 localizados en los cromosomas 2, 3, 6 y 7 respectivamente. A estos genes se les denominó: *PVN2*, *PVN3*, *PVN4* y *PVN5*, respectivamente. Todos ellos contienen en la secuencia de aminoácidos deducida el dominio PF02265 característico de la familia S1/P1 de nucleasas. Al gen Phvul.003G030500 se le asignó la nomenclatura *PVN2* por estar en el mismo cromosoma que *PVN1*, además de mostrar con éste la menor distancia filogenética (Figura 22) y tener una identidad a nivel proteico del 68.6% (Tabla 5). Por otro lado, *PVN1* mostró mayor divergencia con *PVN4* (Tabla 6) y como se puede observar en el cladograma son las nucleasas más alejadas filogenéticamente (Figura 22).

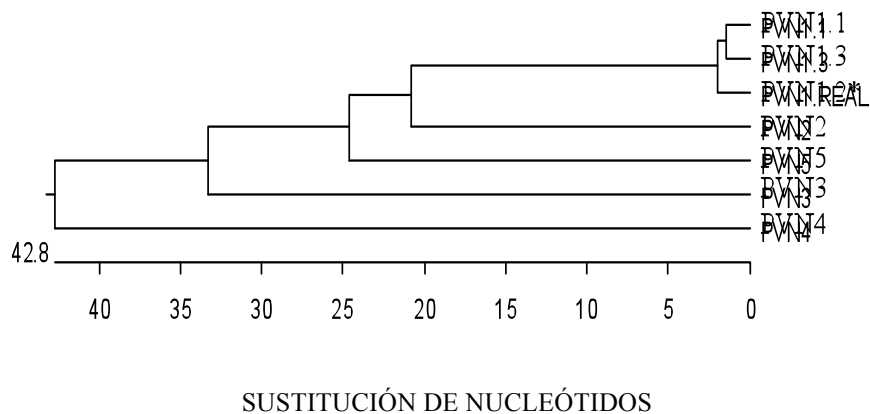


Figura 22. Distancias filogenéticas entre las proteínas deducidas para las nucleasas de la familia S1/P1 en judía. El cladograma ha sido construido con las secuencias aminoacídicas de las nucleasas: *PVN1.1*, *PVN1.2**, *PVN1.3*, *PVN2*, *PVN3*, *PVN4* y *PVN5*.

Tabla 5. Grado de identidad y divergencia a nivel proteico entre las nucleasas de la familia S1/P1 de judía. La tabla ha sido construida con las secuencias aminoacídicas de la figura 22.

	PVN1.2*	PVN1.1	PVN1.3	PVN2	PVN3	PVN4	PVN5	
PVN1.2*	***	97.5	96.2	68.6	54.1	44.7	61.8	PVN1.2*
PVN1.1	2.5	***	98.6	69.6	54.8	45	63.4	PVN1.1
PVN1.3	3.9	1.4	***	66.4	51.7	45.9	61.1	PVN1.3
PVN2	40.6	38.9	44.5	***	54	45	66.8	PVN2
PVN3	69.5	67.9	75.5	69.9	***	49.8	57.6	PVN3
PVN4	95.3	94.3	91.4	94.2	80.3	***	46.3	PVN4
PVN5	52.9	49.9	54.4	43.7	61.6	90.3	***	PVN5

El análisis mediante SeqBuilder de secuencias aminoacídicas de los miembros de la familia S1/P1 reveló que tenían masas moleculares muy similares, aunque los valores de su punto isoeléctrico eran diferentes.

Tabla 6. Características predichas para las nucleasas de la familia S1/P1 de judía

	AMINOÁCIDOS	kDa	PI
PVN1	293	32	4.9
PVN2	294	32	6.02
PVN3	300	35	7.02
PVN4	308	35	5.28
PVN5	284	32	7.03

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la familia S1/P1 nucleasas de judía reveló que los nueve aminoácidos involucrados en la unión de los ligandos Zn, así como los cuatro residuos de cisteína que participan en la formación de los dos puentes disulfuro, están altamente conservados en todas las secuencias (Figura 23). Los aminoácidos susceptibles de estar glicosilados, así como aquellos que constituyen sitios activos en las nucleasas S1/P1, también se encuentran altamente conservados en dichas secuencias.

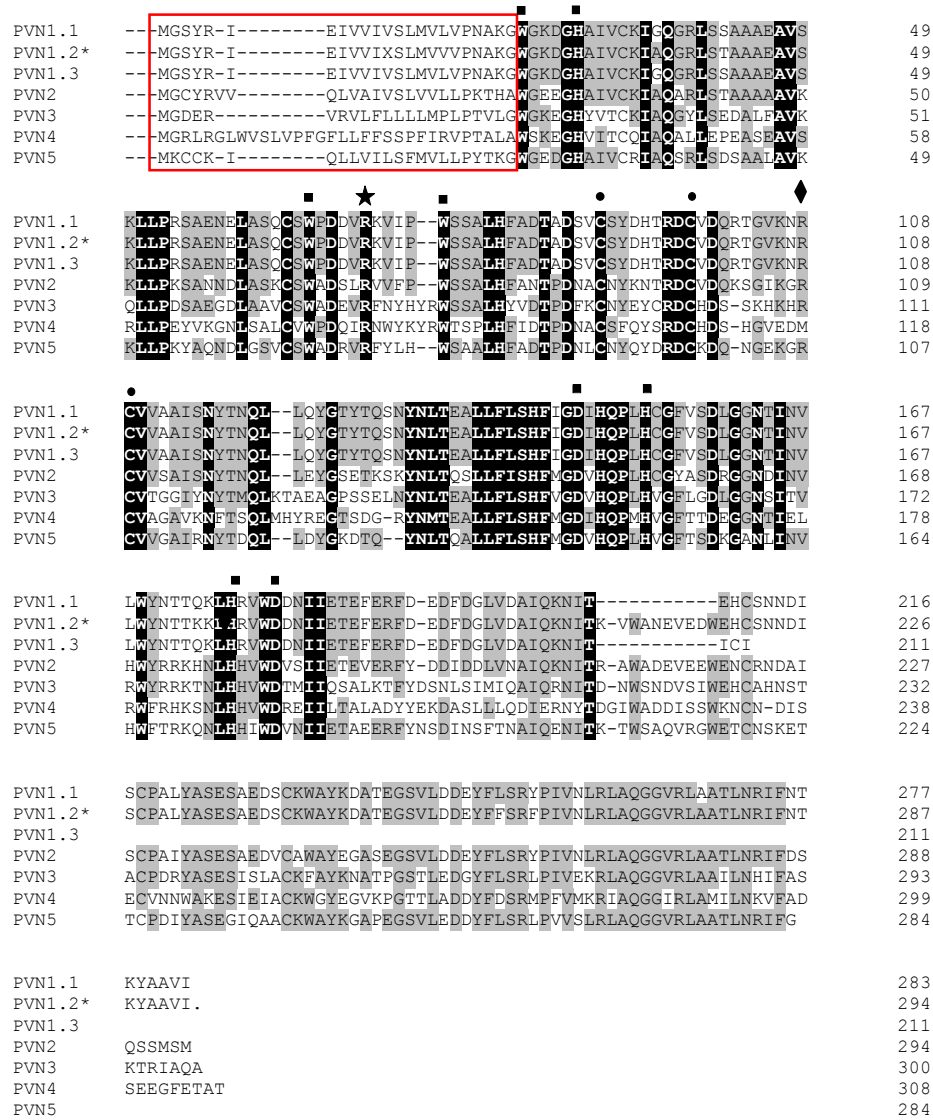


Figura 23. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las nucleasas de la familia S1/P1 de judía. El alineamiento se realizó por el método Clustal W del programa MegAlign con las secuencias aminoacídicas de PVN1.1, PVN1.2*, PVN1.3, PVN2, PVN3, PVN4 y PVN5. En la figura se indican: los aminoácidos conservados en todas las secuencias (sombreado negro), los conservados al menos en 4 de las secuencias (sombreado gris), los residuos que componen los sitios de unión de los ligandos Zn1, Zn2 y Zn3 en P1 (cuadros negros), los residuos involucrados en la formación de puentes disulfuro en la nucleasa P1 (círculos negros) y los péptidos señal (marco roja).

La tendencia evolutiva de las nucleasas se estudió mediante el análisis del árbol filogenético construido a partir de las secuencias aminoacídicas de las nucleasas P1, S1 y los componentes de la familia S1/P1 que se identificaron tras realizar un BLAST en las bases de datos Phytozome, Plaza y NCBI. La búsqueda se realizó con la secuencia de PVN1 en hongos y en algunas plantas vasculares como judía, *Medicago* y arroz (Figura 24). Los diferentes genes que codifican las nucleasas en plantas surgieron a partir de un ancestro común que poseía una única copia del gen S1 y que fue diferente al que originó las nucleasas en musgos, ya que como puede observarse en la Figura 24, los dos genes que componen la familia S1/P1 en *Physcomitrella* se encuentran separados del gran grupo constituido por las nucleasas de plantas. En *Arabidopsis*, al igual que en judía, la familia S1/P1 está compuesta por 5 miembros, mientras que en *Medicago* y arroz cuentan con 6 y 4 miembros, respectivamente. Las secuencias que codifican las nucleasas de la familia S1/P1 constituyen tres grandes clados tanto en plantas monocotiledóneas como en dicotiledóneas encontrándose en cada uno de ellos representados al menos por un miembro.

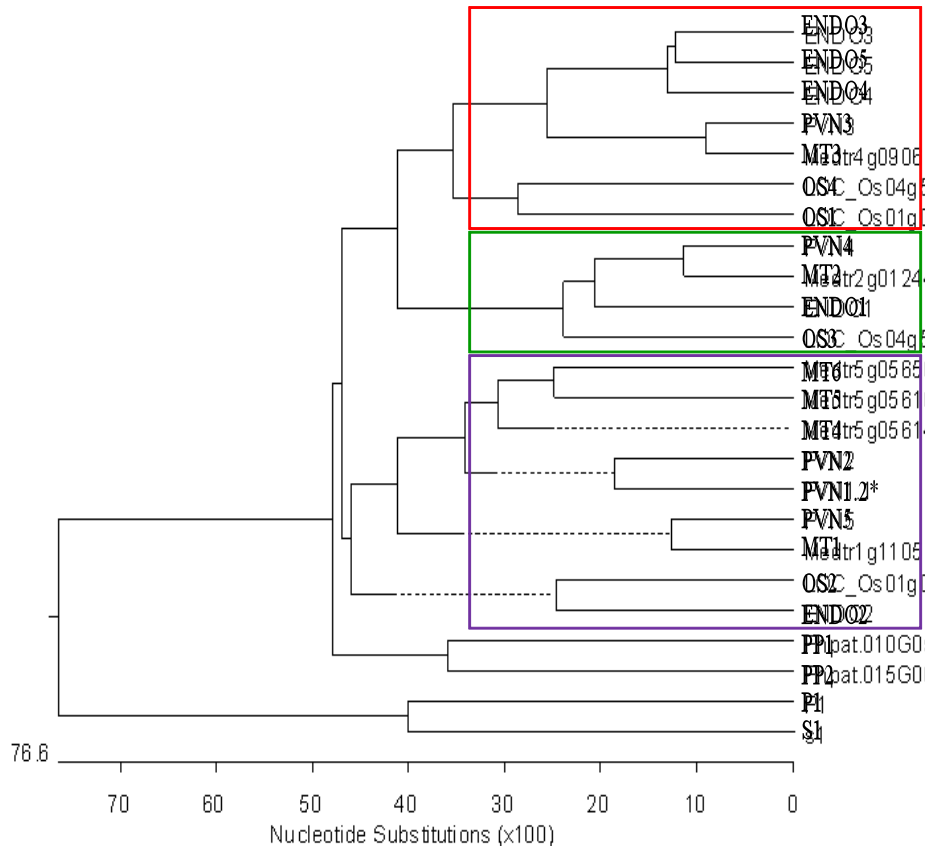


Figura 24. Distancias filogenéticas de las proteínas deducidas de diferentes nucleasas de la familia S1/P1. El cladograma ha sido construido con las secuencias aminoacídicas de las nucleasas de *P.citrimum*: P1; de *A. oryzae* : S1; de *P. vulgaris*: PVN1.2*, PVN2, PVN3, PVN4 y PVN5; de *Medicago truncatula*: MT1 (MT1G110510), MT2 (MT2G012440), MT3 (MT4G09610), MT4 (MT5G056140), MT5 (MT5G056160), MT6 (MT5G056560); de *Arabidopsis thaliana*: BFN1 (ENDO1: AT1G11190), ENDO2 (AT1G68290), ENDO3 (AT4G21590), ENDO4 (AT4G21585), ENDO5 (AT4G21600); de *Oryza sativa*: OS1 (OS01G3730), OS2 (OS01G3740), OS3 (OS04G54390), OS4 (OS04G55850) y de *Physcomitrella patens*: PP1 (Phpat.010G052800), PP2 (Phpat.015G004800). Los tres recuadros representan los clados más importantes en los que se distribuyen las diferentes nucleasas de plantas.

CAPÍTULO 3.

**ACTIVIDAD NUCLEASA Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS
NUCLEASAS DE LA FAMILIA S1/P1 EN EJES DE JUDÍA**

3.1. Nucleasas S1/P1 en ejes de judía durante la germinación y desarrollo postgerminativo temprano

El estudio de la expresión de los genes de las nucleasas de la familia S1/P1 en ejes durante la germinación y desarrollo postgerminativo indicó que únicamente hay expresión del gen *PVN1* y que ésta fue máxima alrededor del momento de la emergencia de la radícula (Figura 25). En ejes aislados de semillas embebidas no se observó expresión del gen a los 0 DDI. El patrón de expresión coincide con el de la actividad nucleasa en estos momentos (Figura 25).

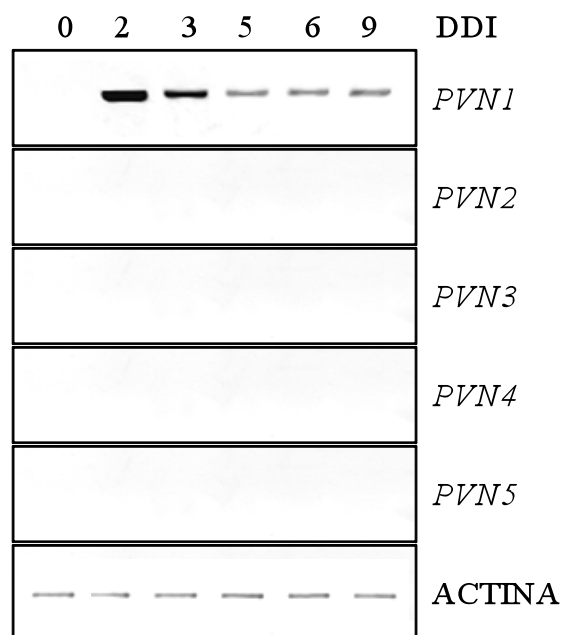


Figura 25. Expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 en ejes. El análisis se realizó con muestras de ejes a los días indicados mediante RT-PCR, utilizándose un programa de 25 ciclos para e la expresión de la actina y 27 ciclos para de las nucleasas.

Los ejes embrionarios de judía de plántulas de 6 DDI se separaron en radícula, hipocotilo y epicotilo. En dichos tejidos se analizó la actividad nucleasa en gel así como la expresión de los distintos genes de la familia S1/P1 (Figura 26). En el ensayo de actividad tanto a pH ácido como neutro se detectó una única banda con actividad nucleasa correspondiente a la proteína de 37 kDa (Figura

26.A). El tejido con mayor actividad fue hipocotilo y el de menor epicotilo. La inclusión de varios cationes a la mezcla de ensayo no supuso la detección de otras proteínas con actividad nucleasa a ambos valores de pH y apenas se afectó a la actividad de la proteína de 37 kDa (Figura 26.A). El análisis de expresión de los genes de la familia S1/P1 reveló expresión mayoritaria del gen *PVN1* en todos los tejidos analizados, registrándose en epicotilo el menor nivel de expresión. Únicamente en radícula se detectó una baja expresión de los genes *PVN2* y *PVN5* (Figura 26.B).

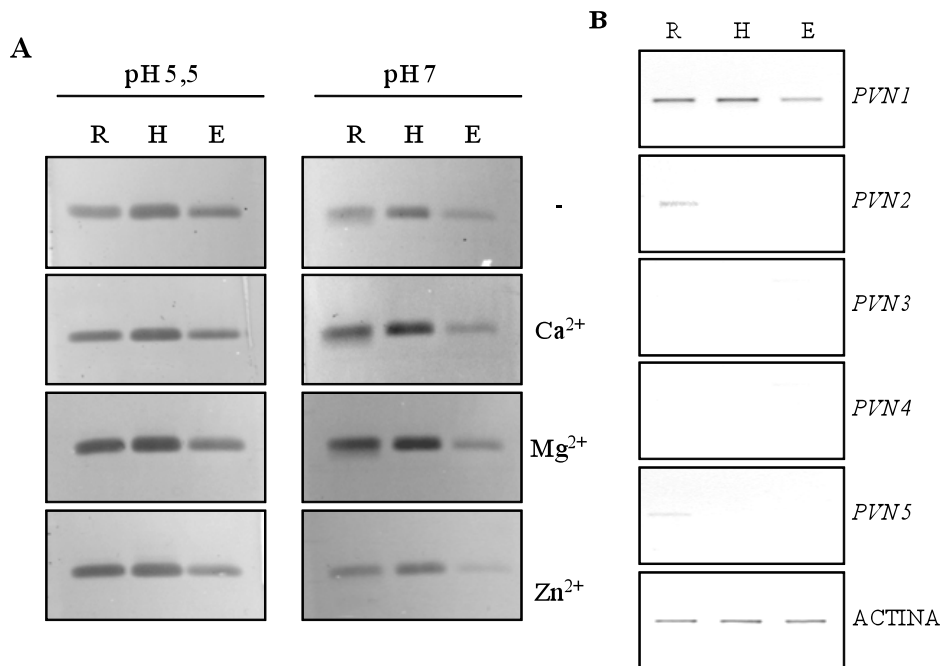


Figura 26. Actividad nucleasa y expresión de nucleasas de la familia S1/P1 en plántulas de judía. **A)** La actividad específica se determinó a los valores de pH indicados en extractos crudos obtenidos de radícula (R), hipocotilo (H) y epicotilo (E) de plántulas de 6 DDI. **B)** Expresión de los genes nucleasas de la familia de S1/P1 en las mismas muestras del apartado A, mediante RT-PCR con un programa de PCR de 25 ciclos para estudiar la expresión de la actina y 27 ciclos para de las nucleasas.

3.2. Actividad nucleasa y expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 en ejes de plántulas etioladas de judía

Se analizó el efecto de la ausencia total de luz durante la germinación y el crecimiento postgerminativo en ejes a los 4 y 6 días. En ejes completos de 4 días etiolados no se observaron diferencias significativas en el desarrollo, en la concentración de proteína soluble, ni en la concentración de ureidos (Figura 27.A). Tras 6 días de desarrollo, la ausencia de luz produjo la etiolización de las plántulas, provocando descenso en el contenido de clorofilas, un mayor desarrollo del eje embrionario e hipocotilos engrosados. Además, la etiolización dio lugar al descenso en la concentración de proteína soluble total por gramo de peso fresco y se observó un descenso en la concentración de ureidos totales tanto en radícula como en parte aérea (Figura 27.B).

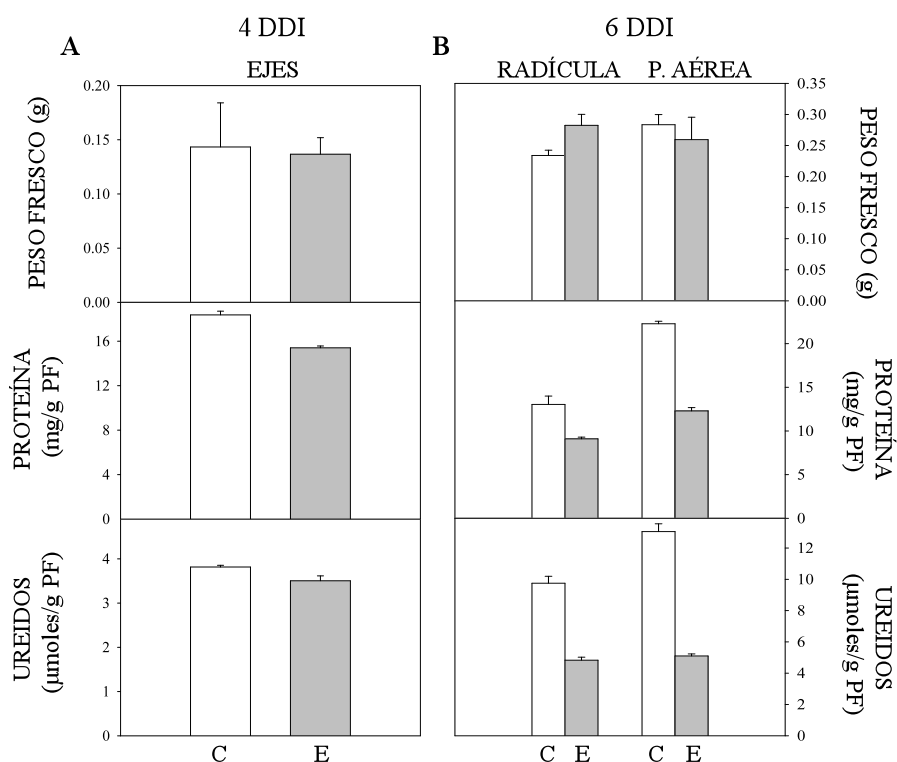


Figura 27. Efecto de la etiolización. Plántulas de judía germinaron y se desarrollaron en condiciones estándar (C) o en ausencia total de luz (E). Se determinó el nivel de proteína soluble total y ureidos totales en extractos crudos obtenidos de ejes completos de 4 DDI (A) y en radícula y parte aérea (P.AÉREA) de plántulas de 6 DDI (B).

La actividad y los valores de expresión de los genes de las nucleasas de la familia S1/P1 se analizaron en ejes en desarrollo de plántulas a los 4 y 6 días desarrolladas en ausencia de luz desde el momento de la imbibición (Figura 28). La única actividad detectada corresponde a la proteína de 37 kDa (Figura 28.A). La actividad fue similar en ejes completos de 4 DDI así como en partes aéreas de 6 DDI mientras que disminuyó en raíces de 6 DDI de plántulas etioladas (Figura 28.A). El mismo resultado se obtuvo en el análisis de la expresión, no hubo cambios en ejes a los 4 DDI ni en parte aérea a los 6 DDI mientras que la expresión de los genes *PVN1*, *PVN2* y *PVN5* disminuyó en radículas de plántulas etioladas (Figura 28.B).

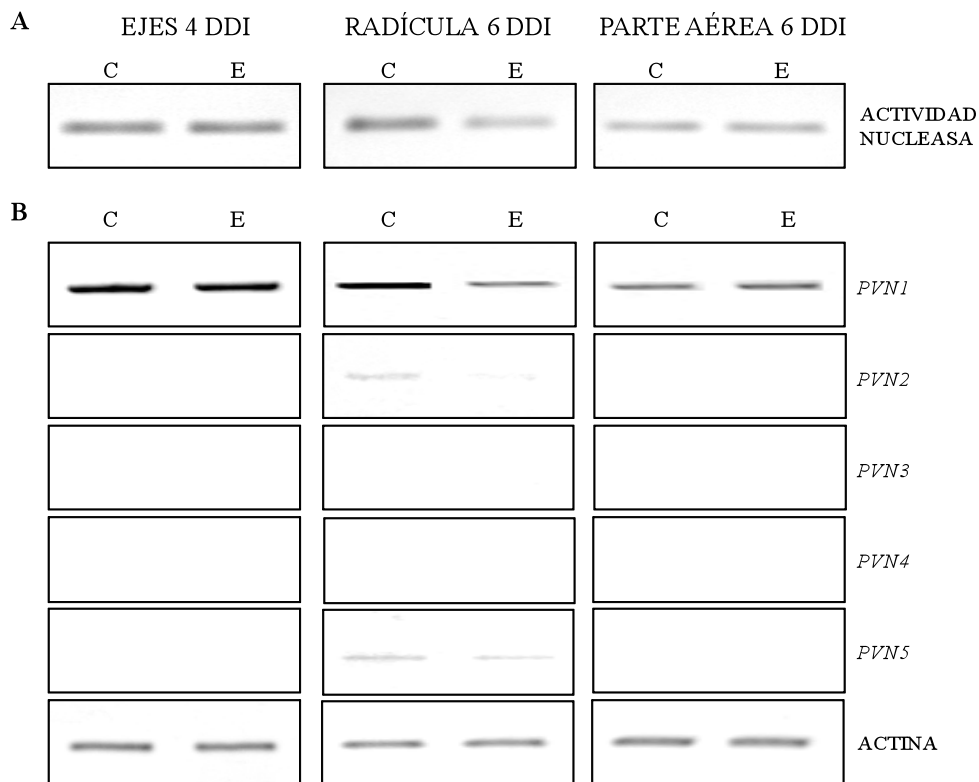


Figura 28. El efecto de la etiolización en la actividad nucleasa y en la expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 en ejes de plántulas de judía. En los mismos extractos de la figura 3.2 de determinó: **A)** Actividad específica determinada a pH 5,5 y **B)** Expresión de los genes nucleasa de la familia S1/P1 mediante RT-PCR con un programa de PCR de 25 ciclos para la actina y 27 ciclos para las nucleasas.

3.3. Efecto del fosfato, nitrato y alopurinol en la actividad nucleasa y en la expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 en ejes de plántulas de judía

La actividad nucleasa en gel de ejes de judía se inhibió por la inclusión de Pi y P_{ii} en el medio de ensayo (Figura 11). Esto podría ser consecuencia de un efecto de inhibición por el producto, ya que estas moléculas son liberadas durante el catabolismo de los ácidos nucleicos. Para analizar el efecto del estado nutricional de las plántulas sobre las nucleasas se añadió fosfato (5mM) y nitrato (10 mM) en el medio de imbibición (Figura 29).

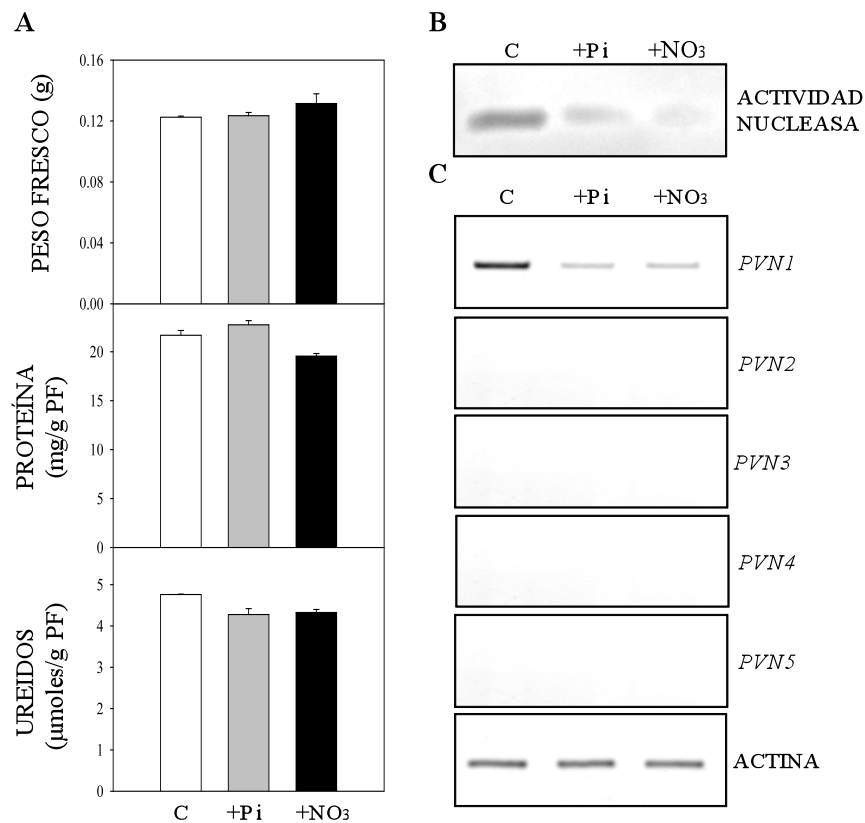


Figura 29. Actividad nucleasa y expresión de las nucleasas S1/P1 en plántulas tratadas con fosfato y nitrato. Semillas de judía germinaron y se desarrollaron en presencia de fosfato 5 mM (+Pi), nitrato 10 mM (+NO₃) y en condiciones estándar (C) hasta los 5 días de desarrollo. **A)** Determinación del peso fresco, de la concentración de proteína soluble y de ureidos totales. **B)** Actividad específica nucleasa a pH 5,5. **C)** Expresión de los genes nucleasa de la familia S1/P1 mediante RT-PCR, con un programa de PCR de 25 ciclos la actina y de 27 ciclos para las nucleasas.

La inclusión de fosfato o nitrato no alteró la germinación ni el desarrollo postgerminativo de plántulas de judía, tampoco afectó a la concentración de proteína soluble o de ureidos determinados a los 5 DDI (Figura 29.A). No obstante, la actividad de la nucleasa de 37 kDa fue menor en los extractos obtenidos de las plántulas desarrolladas en presencia de fosfato y nitrato (Figura 29.B) no detectándose ninguna otra proteína con actividad nucleasa en estas condiciones de ensayo. El análisis de la expresión de los miembros de la familia nucleasas S1/P1 mostró una inhibición en la expresión de *PVNI* y *PVN2* en ejes de plántulas desarrolladas en presencia de estos compuestos (Figura 29.B). No se detectó expresión de otro miembro de la familia S1/P1 en presencia de fosfato o nitrato (Figura 29.C).

Para determinar la posible relación entre la concentración de ureidos y la actividad nucleasa se incluyó en el medio de imbibición alopurinol, un inhibidor de la xantina deshidrogenasa y que reduce la concentración de ureidos en judía. El alopurinol provocó un menor desarrollo de los ejes y una reducción de la concentración de ureidos en ejes de 4 DDI, mientras que la concentración de proteína soluble no varió (Figura 30.A). La actividad nucleasa en gel de la proteína de 37 kDa no mostró variaciones significativas (Figura 30.B), ni tampoco se detectó otra proteína con actividad nucleasa en el gel. La inclusión de alopurinol no afectó a la expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 (Figura 30.C).

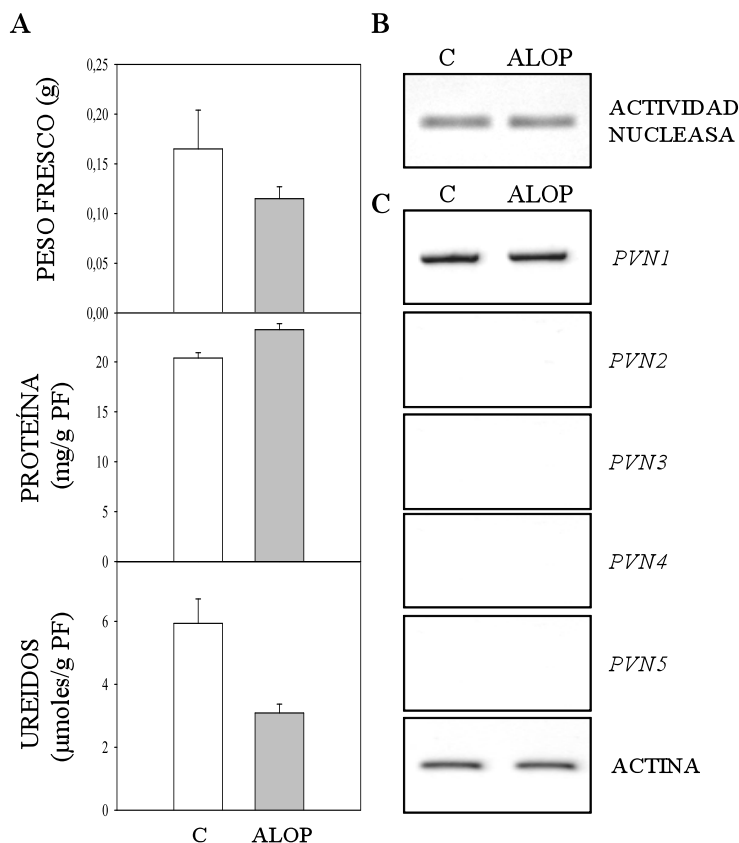


Figura 30. Efecto de la inclusión del alopurinol en el medio de imbibición de plántulas de judía. Plántulas de judía germinaron y se desarrollaron en ausencia (C) y presencia de alopurinol (1 mM) en el medio de imbibición hasta los 4 días y se analizaron ejes completos. **A)** Determinación del peso fresco, la concentración de la proteína soluble total y de ureidos totales. **B)** Actividad nucleasa específica a pH 5,5. **C)** Expresión de los genes de las nucleasas de la familia S1/P1, con un programa de 25 ciclos para la actina y 27 ciclos para las nucleasas.

3.4. Efecto de condiciones adversas en la actividad nucleasa y expresión de la familia S1/P1 en ejes de plántulas de judía

Se analizó el efecto de la inclusión de cloruro sódico 50 y 100 mM al medio de imbibición durante la germinación y desarrollo postgerminativo en plántulas a los 5 DDI (Figura 31). El tratamiento con estas concentraciones de sal no afectó a la tasa de germinación aunque el peso fresco de los ejes sí se redujo ligeramente con 100 mM de sal. No se observó diferencias en la concentración de proteína soluble total ni en la de ureidos en las plántulas tratadas (Figura

31.A). La actividad nucleasa fue similar en todos los casos, observándose sólo actividad de la proteína de 37 kDa (Figura 31.B). El tratamiento tampoco afectó a la expresión de la nucleasa *PVN1*, ni se detectó expresión de ningún otro miembro de la familia S1/P1 (Figura 31.C).

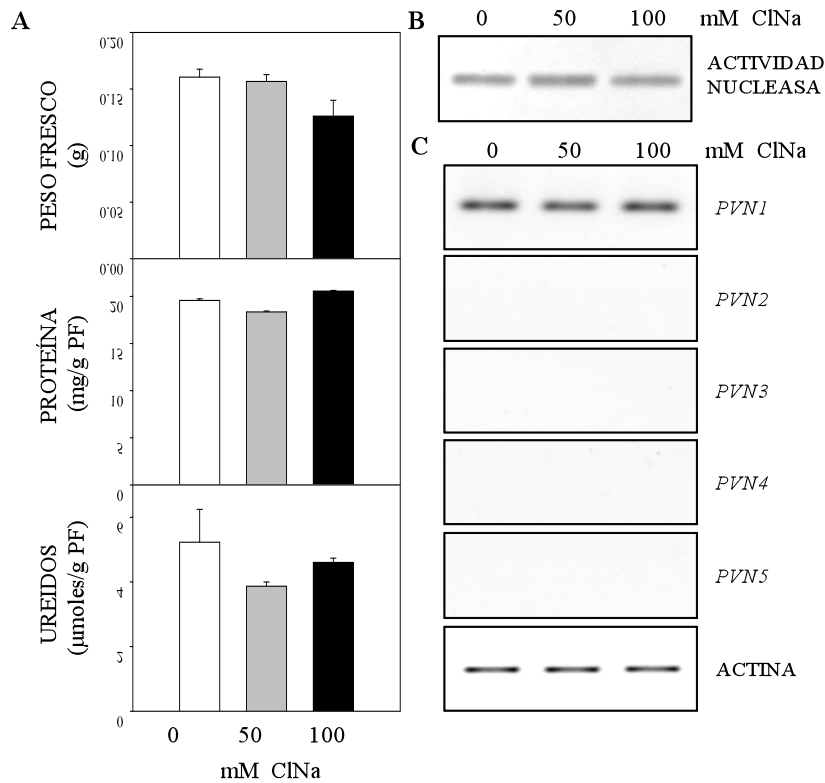


Figura 31. Efecto del estrés salino en ejes de judía. Plántulas de judía se desarrollaron hasta los 5 DDI en presencia de 50 mM y 100 mM de NaCl en el medio de imbibición. **A)** Determinación del peso fresco, la concentración de proteína soluble total y de ureidos totales. **B)** Actividad nucleasa específica a pH 5,5. **C)** Expresión los genes de la familia S1/P1 mediante RT-PCR con un programa de PCR de 25 ciclos para la actina y 27 ciclos para las nucleasas.

También se analizó el efecto del tratamiento con metil-jasmonato durante 24 horas en radículas y partes aéreas de plántulas de 6 DDI (Figura 32). Este tratamiento afectó al desarrollo de las radículas, incrementando ligeramente el número de raíces secundarias. No se encontraron diferencias en el contenido en

proteína soluble. El nivel de ureidos en radículas de las plántulas tratadas fue ligeramente superior tanto por peso fresco como por proteína soluble (Figura 32.A). La actividad nucleasa de la proteína de 37 kDa mostró un ligero incremento en radículas de las plántulas tratadas (Figura 32.B), siendo la única actividad detectada. El análisis de la expresión de las nucleasas S1/P1 reveló un incremento significativo en la expresión de la nucleasa *PVN1* y *PVN2* sólo en raíces tratadas con jasmonato. La nucleasa *PVN5* no modificó su expresión y las otras dos nucleasas de la familia S1/P1 se detectaron bajo estas condiciones (Figura 32.C).

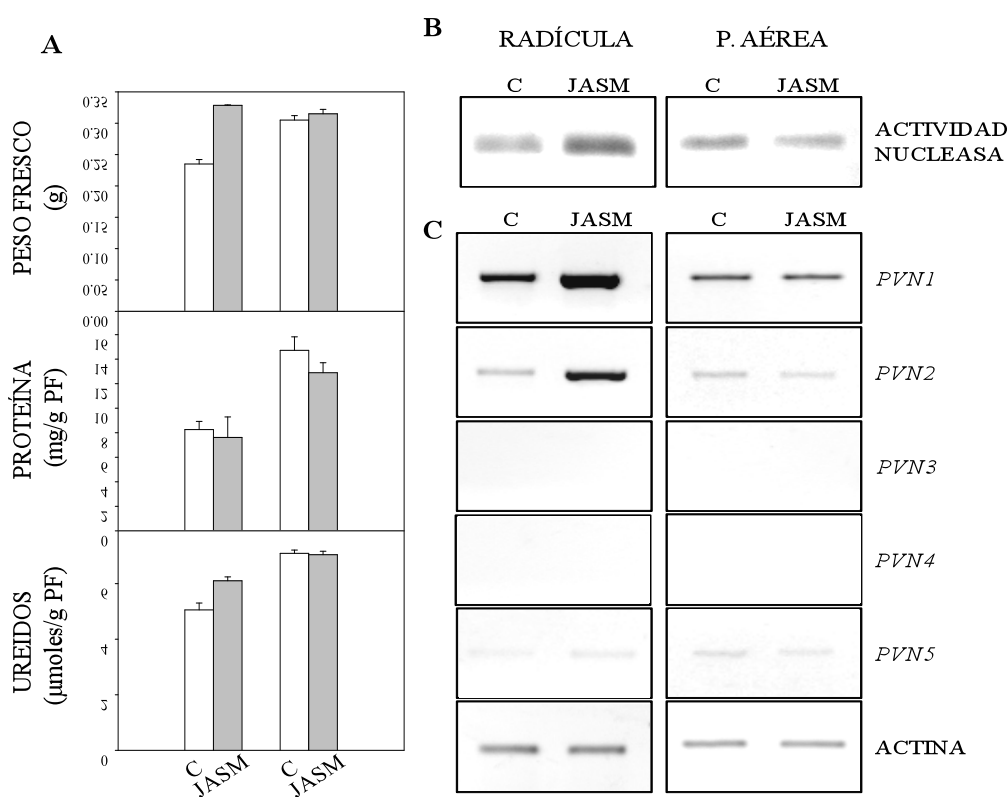


Figura 32. Efecto del metil-jasmonato en plántulas de judía. Plántulas de judía de 6 DDI se trataron durante 24 horas con metil-jasmonato (Jasmin *et al.*) y se analizaron frente a plántulas germinadas y desarrolladas bajo condiciones estándar (C). Los ejes de las plántulas se separaron en radículas y partes aéreas (P.AÉREA). **A**) Determinación del peso fresco, de la cantidad de proteína soluble total y de ureidos totales. **B**) Actividad nucleasa específica a pH 5,5 **C**). Expresión de los genes de la familia S1/P1 mediante RT-PCR, con un programa de PCR de 25 ciclos para la actina y 27 ciclos para las nucleasas.

Con la finalidad de determinar el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la actividad nucleasa y en la expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 de ejes de judía, se estudió el efecto de la adición de peróxido de hidrógeno (10 mM) desde el inicio de la imbibición hasta 4 DDI. El tratamiento no afectó a los valores de proteína soluble ni de ureidos, pero sí provocó la reducción del peso fresco de los ejes (Figura 33.A). La actividad nucleasa de la proteína de 37 kDa no se afectó y fue la única actividad determinada en el ensayo en gel (Figura 33.B). Tampoco mostró variación la expresión de *PVN1* ni de los demás miembros de la familia S1/P1 nucleasas (Figura 33.C).

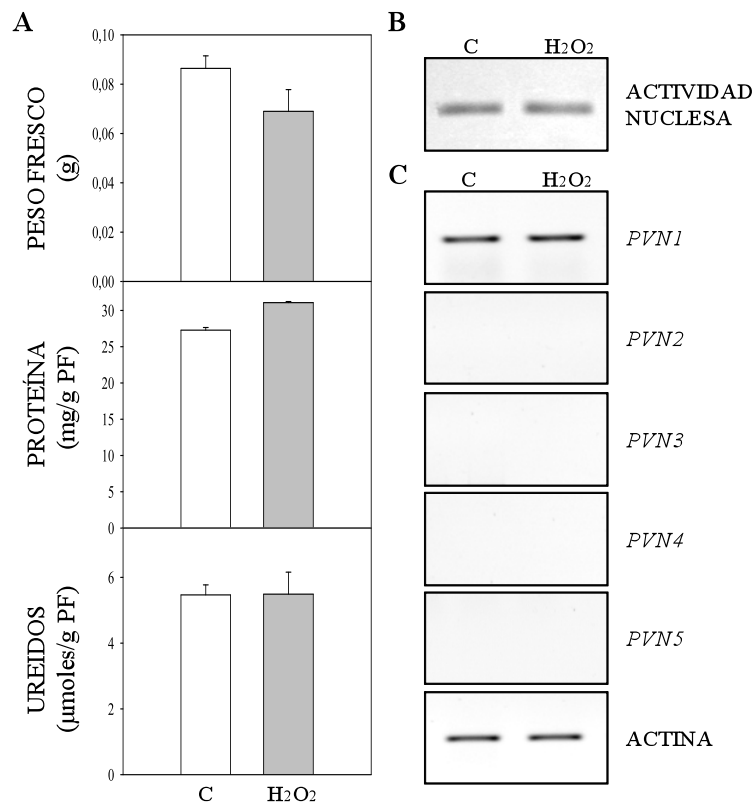


Figura 33. Efecto del peróxido de hidrógeno en plántulas de judía. Plántulas de judía se desarrollaron hasta los 4 DDI en condiciones estándar (C) y en presencia de 1 mM de H₂O₂ (H₂O₂). **A)** Peso fresco del material, cantidad de proteína y ureidos de los extractos crudos obtenidos. **B)** Actividad nucleasa específica a pH 5,5. **C).** Expresión de los genes de la familia S1/P1 mediante RT-PCR, con un programa de 25 ciclos para la actina y 27 ciclos para las nucleasas.

CAPÍTULO 4.

**LAS ACTIVIDADES NUCLEASAS Y EXPRESIÓN DE NUCLEASAS
DE LA FAMILIA S1/P1 DURANTE EL DESARROLLO DE LA
PLANTA ADULTA DE JUDÍA**

4.1. Actividades nucleasas y expresión de la familia S1/P1 en flores y frutos

La actividad nucleasa se determinó en extractos crudos obtenidos a partir de flores en distintos estadios del desarrollo, llevando a cabo el ensayo tanto a pH ácido como neutro y en presencia de cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}) (Figura 34). Únicamente se detectó una proteína con actividad nucleasa con una masa molecular aparente de 37 kDa cuando el ensayo se realizó a pH 5,5 y los valores de actividad fueron similares en los tres estadios (Figura 34.B). La actividad de esta nucleasa incrementó con la inclusión de Zn^{2+} en el ensayo y no se detectó ninguna otra actividad nucleasa con la inclusión de los cationes en el ensayo (Figura 34.B).

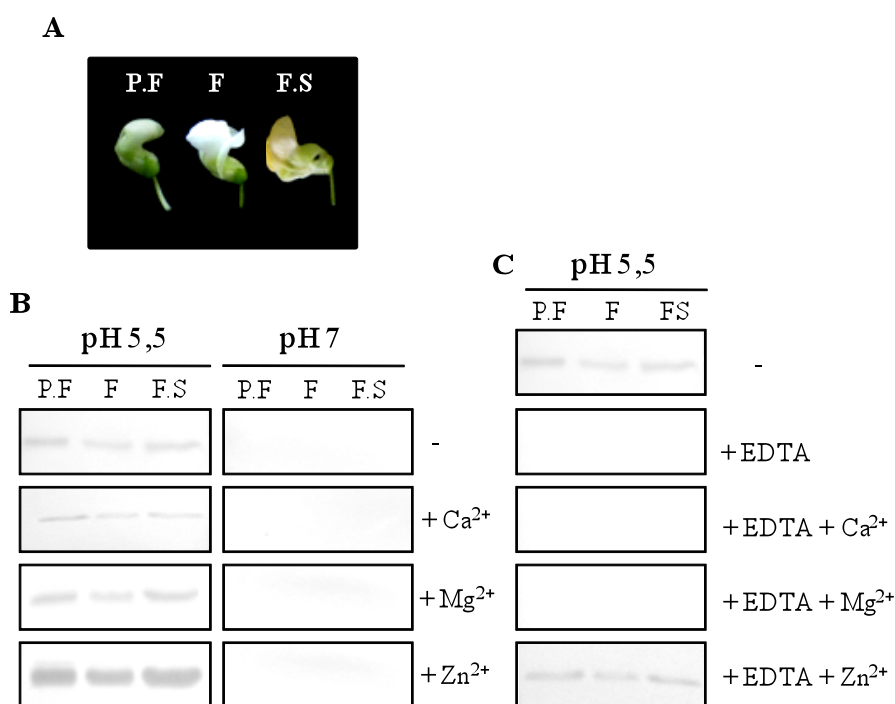


Figura 34. Actividad nucleasa en flores de judía. A) Fotografías de flores en los distintos estadios analizados (P.F: primordio floral, F: flor adulta, F.S: flor senescente) B) Actividad nucleasa específica en extractos crudos obtenidos a partir del material indicado en el panel A, determinada a los valores de pH indicados y en ausencia (-) o presencia de los cationes indicados a una concentración final de 0,1 mM C) La actividad nucleasa se determinó a pH 5,5 en ausencia de EDTA y metales (-), en presencia de 1 mM EDTA (+EDTA) y en presencia de EDTA de los cationes indicados a una concentración final de 5 mM.

La actividad nucleasa se inhibió tras la incubación con el agente quelante EDTA. Dicha inactivación sólo se revertió por la inclusión de Zn^{2+} (Figura 34.C). Estos datos sugieren que se trata de una metaloenzima dependiente de Zn^{2+} . La proteína de 37 kDa con actividad nucleasa en los extractos de diferentes estadios de flor es una glicoproteína, puesto que la determinación de la actividad tras incubar con concanavalina-A mostró una inhibición total de la actividad (Figura 35).



Figura 35. Efecto de la concanavalina-A en la nucleasa de flor. El extracto crudo de las muestras de la Figura 4.3 se incubó 1 h a temperatura ambiente en ausencia (-) y en presencia de concanavalina-A (+Conc-A) y a continuación se determinó la actividad nucleasa específica a pH 5.5.

El análisis de la expresión de los miembros de la familia S1/P1 en los diferentes estadios de flores mostró expresión mayoritaria del gen *PVNI*, sin diferencias en el nivel entre los diferentes estadios (Figura 36), también se detectó una expresión muy baja de *PVN2* en todos los estadios y un ligero incremento de la expresión *PVN5* a lo largo del desarrollo (Figura 36.A). Entre los posibles transcritos del gen *PVNI* sólo se observó expresión de *PVNI.2* (Figura 36.B).

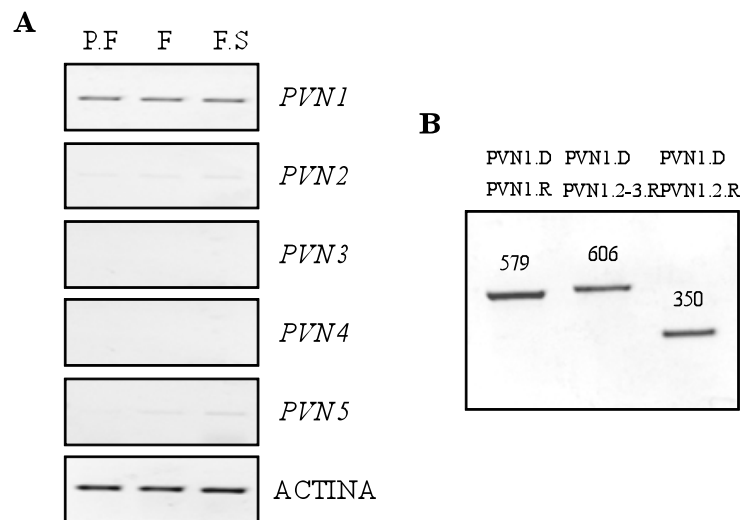


Figura 36. Estudio de la expresión de nucleasas de la familia S1/P1 en flores de diferentes estadios de desarrollo. A) El análisis de la expresión se realizó mediante RT-PCR y utilizando ADN molde procedente de primordio floral (P.F), flor desarrollada (F) y flor senescente (F.S). El programa de PCR fue de 25 ciclos para la actina y 30 para las nucleasas. B) Estudio de la expresión de los diferentes transcritos en flor de judía. En la figura se muestran los productos de las PCRs realizadas utilizando como molde ADN copia de flor (F) y utilizando las parejas de oligonucleótidos indicadas en la figura. El programa de PCR fue de 30 ciclos y las distintas. EL tamaño (pb) de los productos de PCR se indica encima de cada banda.

La actividad nucleasa se determinó en frutos de plantas de judía agrupados en base a su tamaño en frutos A (2-4 cm), B (4-10 cm) y C (11-12 cm) (Figura 37). Los frutos en los estadios A y B se analizaron completos y el fruto en estadio C se separó en vaina (V) y en semilla en formación (S) (Figura 37.A). La actividad nucleasa de la semilla en desarrollo (S) fue mucho mayor a la determinada en las demás muestras de frutos y por lo tanto se analizó por separado. Los ensayos de actividad en gel se realizaron a pH ácido (5,5) y neutro (7) y en ausencia o presencia de metales (Figura 37.B). En los frutos más pequeños (frutos A) se detectaron dos proteínas con actividad nucleasa de masas moleculares de 37 y 34 kDa. La mayor de ellas mostró mayor actividad a pH ácido, mientras que la menor tuvo mayor actividad a pH neutro. En los frutos B, así como en las vainas de los frutos C, aunque con menor actividad,

se detectó actividad sólo de la nucleasa de 34 kDa. En muestras de semilla en desarrollo (S) únicamente se detectó una nucleasa de 32 kDa cuando el ensayo se realizó a pH neutro.

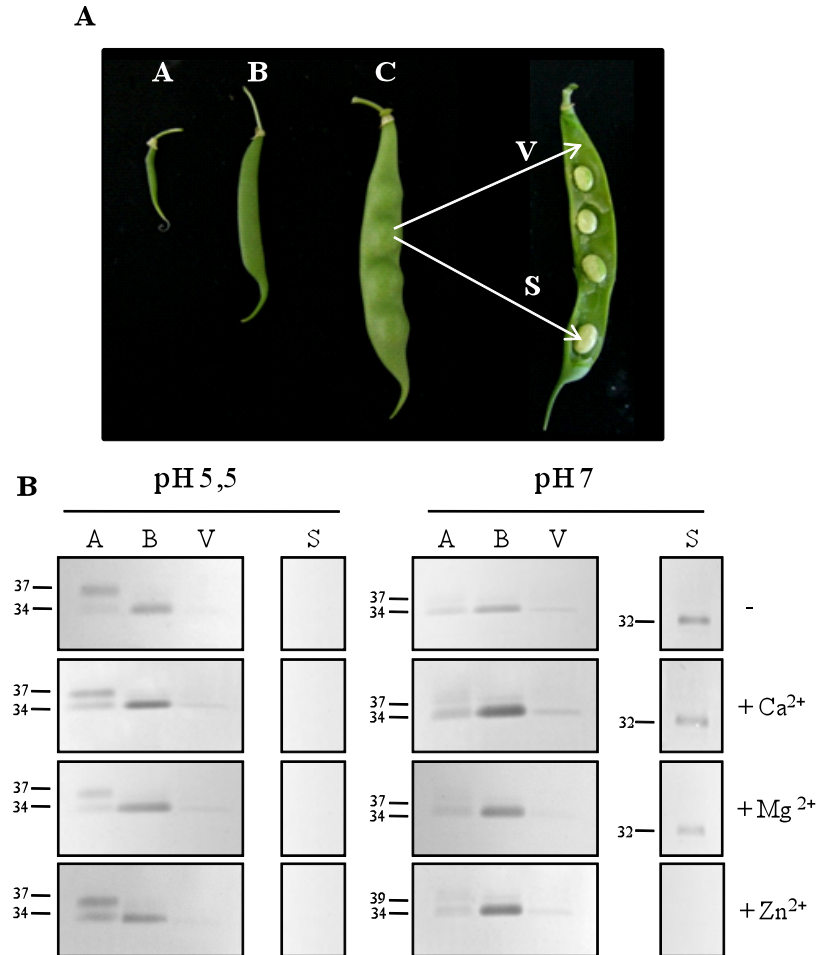


Figura 37. Actividad nucleasa en frutos de plantas de judía. A) Fotografía de los frutos en los distintos estadios estudiados: A (4 cm), B (4-10 cm), C (10 cm) separados en valvas (V) y semilla en desarrollo (S). B) Actividad nucleasa específica. Los geles se desarrollaron a los valores pH indicados y en ausencia (-) o presencia de los cationes indicados a una concentración final de 0,1 mM. El tamaño de las proteínas (kDa) se indica a la izquierda de cada gel.

La presencia de cationes (Ca²⁺, Mg²⁺ y Zn²⁺) en el ensayo no afectó a las actividades nucleasas, a excepción de la nucleasa de 32 kDa de semilla que se inhibió en presencia de Zn²⁺. Tampoco en presencia de estos cationes se

detectó ninguna nueva actividad nucleasa (Figura 37.B). El tratamiento con concanavalina-A de los extractos de frutos y semillas en desarrollo provocó la inhibición total de las actividades nucleasas sugiriendo que todas ellas se tratan de glicoproteínas (Figura 38).

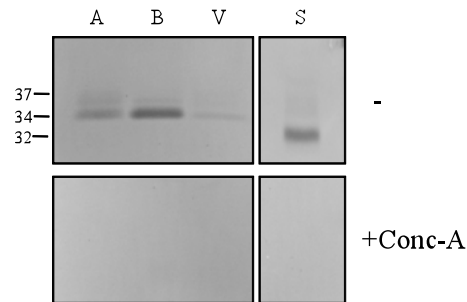


Figura 38. Efecto de la concanavalina-A en las nucleasas de frutos y semillas. El extracto crudo de las muestras de la Figura 37 se incubó 1 h a temperatura ambiente en ausencia (-) y en presencia de concanavalina-A (+Conc.A) y posteriormente se determinó la actividad nucleasa específica a pH 7.

Con respecto a la expresión de los genes de las nucleasas de la familia S1/P1 en los diferentes estadios de fruto, se observó expresión de *PVNI* y *PVN5* (Figura 39). La expresión de *PVNI* disminuyó a lo largo del desarrollo, de tal forma que, en vainas del estadio C su expresión fue prácticamente nula. En cambio, la expresión de *PVN5* aumentó a lo largo del desarrollo mostrando una elevada expresión en semillas (Figura 39.A). En fruto A y en semillas en desarrollo se analizó cuál de los tres posibles transcritos del gen *PVNI* se estaban expresando (Figura 39.B). El análisis de los fragmentos de PCR indicó que *PVN1.2* era el transcrito expresado en ambos tejidos.

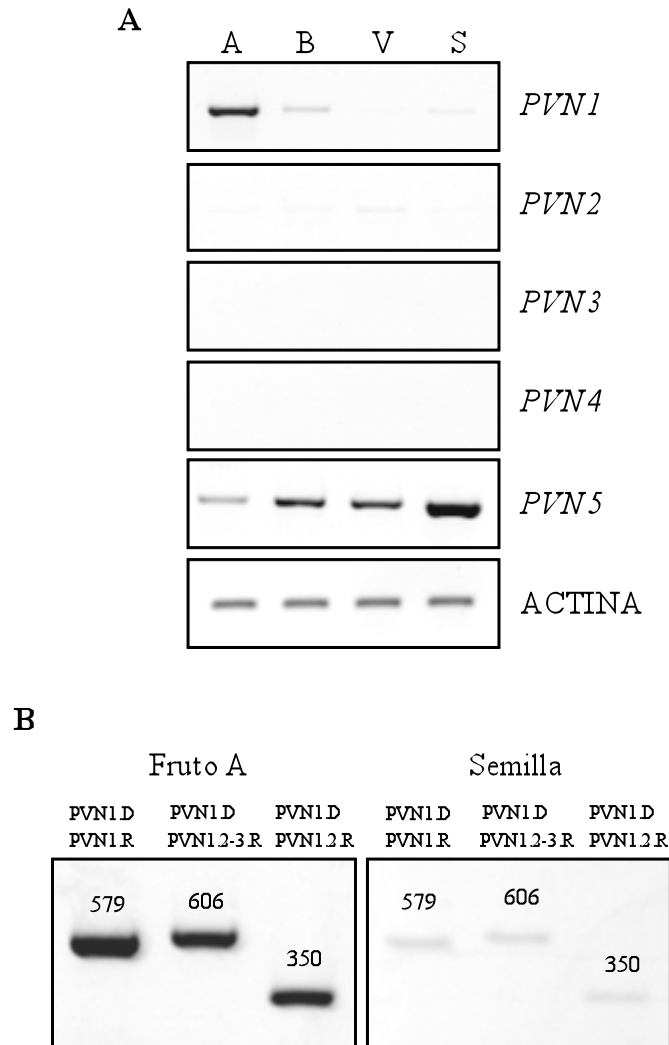


Figura 39. Estudio de la expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 en frutos y semillas en desarrollo de judía. **A)** Expresión mediante RT-PCR utilizando ADN molde procedente de las muestras de la Figura 4.6. La PCR consistió en un programa de 25 ciclos para la de actina y 27 ciclos para las nucleasas. **B)** Estudio de la expresión de los diferentes transcritos en fruto A y semilla en desarrollo de judía. En la figura se muestran los productos de las PCRs realizadas utilizando como molde ADN copia de ejes de fruto A y semilla en desarrollo, utilizando las parejas de oligonucleótidos indicadas en la figura. El programa de PCR fue de 30 ciclos. Sobre cada producto de PCR se indica su tamaño en pb.

4.2. Actividades nucleasas y expresión de la familia S1/P1 en hojas de judía

4.2.1. Desarrollo natural de la hoja

En primer lugar se determinaron diferentes compuestos asociados con la senescencia en extractos crudos obtenidos a partir de la primera hoja trifoliada de plantas cultivadas con nitrato. Se analizó el intervalo de tiempo comprendido entre los días 25 y el 45 desde el inicio de la imbibición. La cantidad de clorofila (Figura. 40.A) y de proteína soluble (Figura 40.B) se mantuvieron constantes hasta el día 35. A partir de ese momento comenzaron a descender y los valores en el día 45 fueron de aproximadamente el 50% de los iniciales. Este descenso coincidió con el amarilleamiento de la hoja e indicaría el inicio de la senescencia.

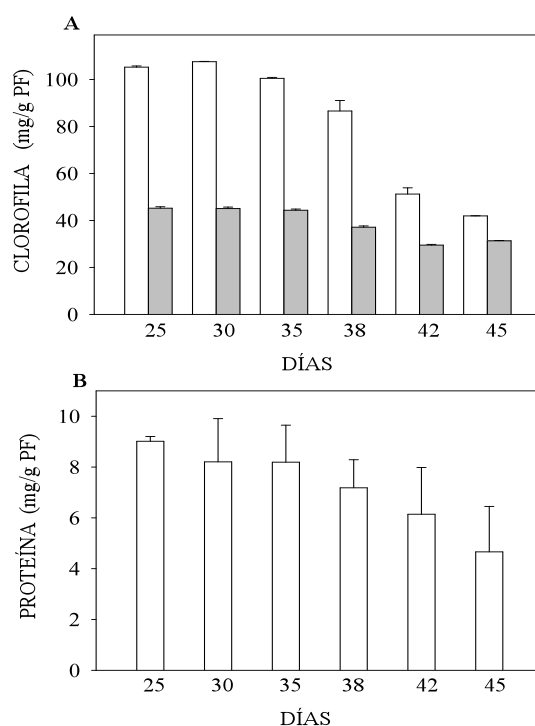


Figura 40. Concentración de clorofila y de proteína en la primera hoja trifoliada de judía a lo largo de su desarrollo. Se recogieron las primeras hojas trifoliadas de plantas de judía cultivadas con nitrato a los días indicados tras el inicio de la imbibición de las semillas. **A)** Concentración de clorofila a (columnas blancas) y clorofila b (columnas grises). **B)** Concentración de proteína soluble total.

La concentración de ureidos, a diferencia de la de proteína o clorofila, se mantuvo constante durante el desarrollo cuando los valores se normalizaron por peso fresco de la hoja (Figura 41.A). El descenso en el nivel de proteína soluble hace que los valores incrementen durante la senescencia al normalizar los ureidos por este parámetro (Figura 41.B). La actividad alantoinasa se detectó en todas las hojas analizadas observándose un descenso en la actividad por peso fresco a lo largo de la senescencia de la hoja (Figura 41.C). La actividad alantoinasa específica fue mayor en las hojas más jóvenes (25 DDI) y en el resto de las hojas los valores fueron similares (Figura 41.D).

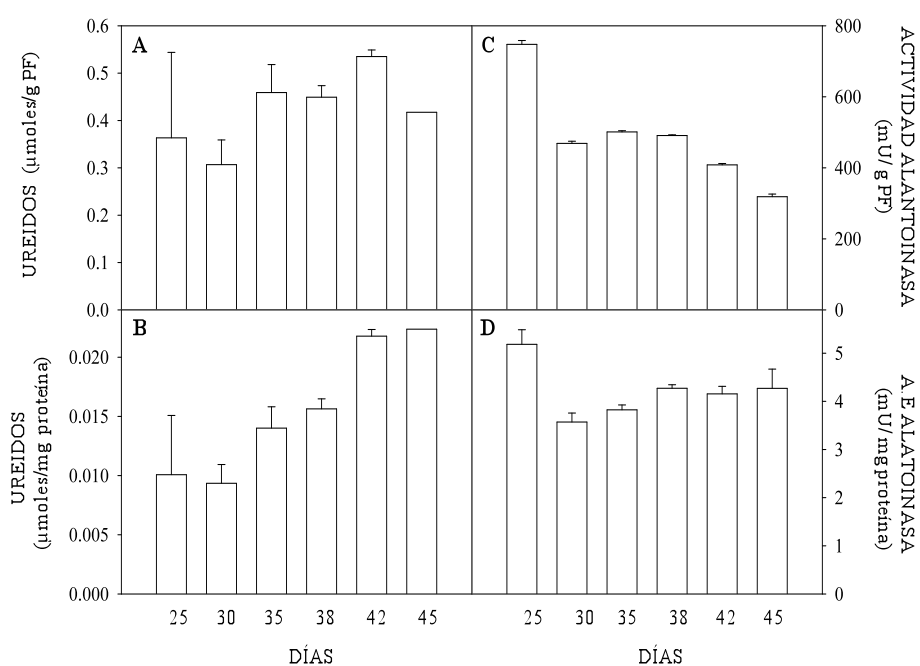


Figura 41. Concentración de ureidos y actividad alantoinasa a lo largo del desarrollo de hojas de judía. Las determinaciones se realizaron en los mismos extractos analizados en la Figura 40. **A)** Concentración de ureidos totales normalizados por gramo de peso fresco. **B)** Concentración de ureidos totales normalizados por proteína. **C)** Actividad alantoinasa normalizada por peso fresco. **D)** Actividad alantoinasa específica.

En los mismos extractos se analizó la actividad nucleasa normalizada por peso fresco y por cantidad de proteína soluble total (Figura 42) tanto a pH ácido como neutro. Sólo se detectaron dos nucleasas de 39 y 34 kDa en los extractos de hojas senescentes y sólo cuando la actividad se desarrolló a pH 7 (Figura 42). Estas dos nucleasas que se inducen durante la senescencia en hojas son glicoproteínas, ya que el tratamiento con concanavalina-A inhibió por completo su actividad (Figura 43).

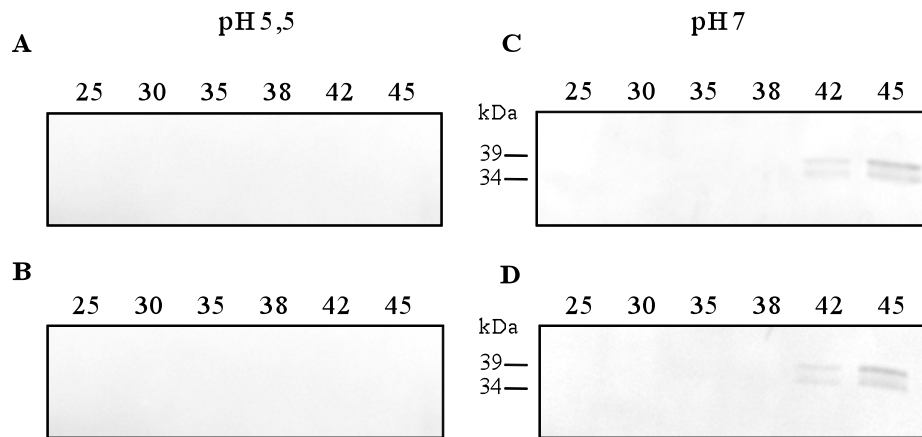


Figura 42. Actividad nucleasa a lo largo del desarrollo de la primera hoja trifoliada de judía. La actividad nucleasa se determinó en los mismos extractos indicados en las Figuras 40 y 41 a los valores de pH indicados y normalizando frente a la misma cantidad de proteína soluble (A y C) y por peso fresco (B y D). La masa molecular aparente de las nucleasas identificadas se indica a la izquierda de cada panel.

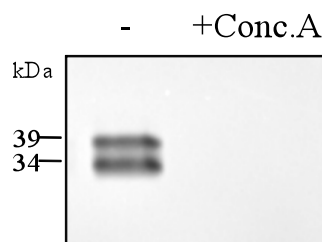


Figura 43. Efecto de la concanavalina-A en las nucleasas hojas senescentes. El extracto crudo de las muestras de hojas senescentes de 45 días se incubó 1 h a temperatura ambiente en ausencia (-) y en presencia de concanavalina-A (+Conc.A) y posteriormente se determinó la actividad nucleasa a pH 7, desarrollando la actividad durante 90 min.

El análisis de expresión de los miembros de la familia S1/P1 en la primera hoja trifoliada a lo largo del desarrollo reveló expresión de los genes *PVN2* y *PVN5* en todos los estadios estudiados (Figura 44). La expresión de ambos genes fue superior en las hojas senescentes, y la inducción fue superior para el gen *PVN2* (Figura 44).

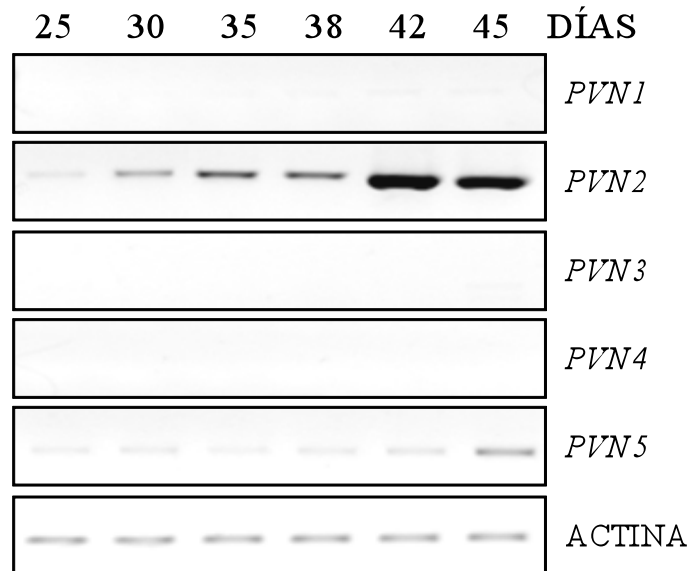


Figura 44. Expresión de la familia S1/P1 durante el desarrollo de la primera hoja trifoliada de judía. El análisis de la expresión de los genes de la familia S1/P1 se realizó mediante RT-PCR en las mismas muestras indicadas en para las Figuras 40 y 41. El programa de PCR fue de 25 ciclos para la actina y 27 para las nucleasas.

4.2.2. Senescencia inducida por oscuridad

La senescencia inducida por oscuridad se analizó en la primera hoja trifoliada de plantas de judía de 25 días cultivadas con nitrato. El proceso de senescencia se indujo sometiendo a la hoja a oscuridad continua utilizando dos aproximaciones experimentales distintas. Las hojas se cortaron de plantas y se mantuvieron en placas de Petri sobre papel humedecido en oscuridad continua, o bien, las hojas se envolvieron en papel de aluminio en la propia planta sin cortarlas. En primer lugar, se determinaron diferentes compuestos asociados con la senescencia (Figura 45). La senescencia inducida por oscuridad provocó

un acusado descenso del nivel de clorofila a (Figura 45.A) y de clorofila b (Figura 45.B) y de la cantidad de de proteína soluble total (Figura 45.C). La senescencia inducida por oscuridad provocó un incremento en la concentración de ureidos, siendo dicho incremento menor cuando la hoja se mantuvo en contacto con la planta (Figura 45.D).

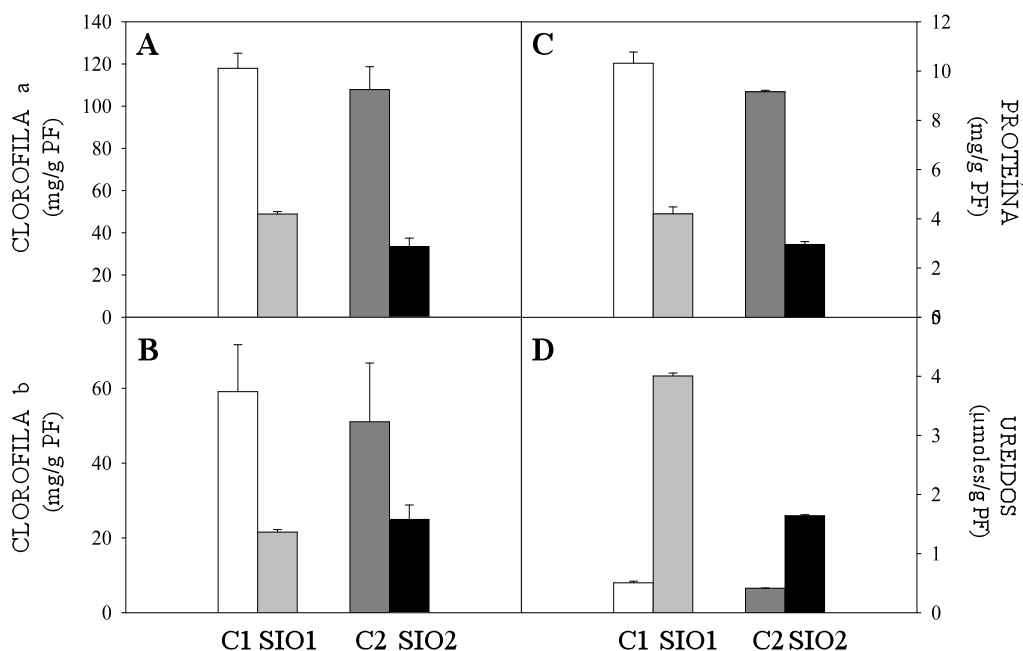


Figura 45. Parámetros asociados a la senescencia en hojas de judía sometidas a senescencia inducida por oscuridad. Se obtuvieron extractos crudos a partir de las primeras hojas trifoliadas de plantas de 25 días tras el inicio de la imbibición (C1: barras blancas), de plantas de 31 días de edad en condiciones estándar (C2: barras gris oscuro), de hojas aisladas de la planta de 25 días y mantenidas en placas de Petri en ausencia de luz durante 6 días (SIO1, barras gris claro), y hojas mantenidas en ausencia de luz durante 6 días en la planta de 25 días de desarrollo (SIO2: barras negras). En estos extractos se determinó: **A)** Nivel de clorofila a, **B)** Nivel de clorofila b, **C)** Concentración de proteína soluble y **D)** Concentración de ureidos totales.

En estos mismos extractos de hojas se analizó la actividad nucleasa tanto a pH ácido (5,5) como neutro (7) y en ausencia de cationes (Figura 46). Únicamente se detectó actividad nucleasa en muestras de hojas senescentes y cuando el ensayo se realizó a pH 7. Al igual que se observó en la senescencia natural (Figura 46), las nucleasas detectadas tenían una masa molecular aparente de 34

y 39 kDa (Figura 46). Esta inducción se observó tanto al normalizar frente a peso fresco de material como por proteína soluble total.

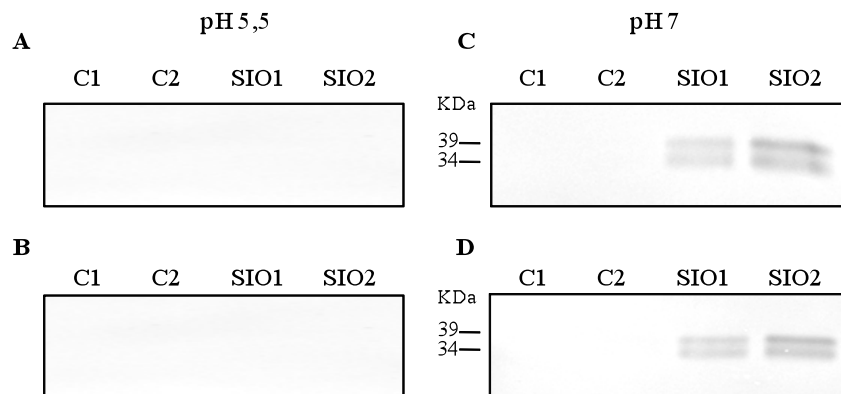


Figura 46. Actividad nucleasa en hojas de judía en las que se indujo la senescencia por oscuridad. En los mismos extractos indicados en la Figura 45 se determinó la actividad nucleasa a los valores de pH indicados. Los valores de actividad se normalizaron por peso fresco (A y B) y por proteína soluble (C y D). Las masas moleculares aparentes de las nucleasas identificadas se indican a la izquierda del panel.

Los valores de actividad de las nucleasas anteriores (34 y 39 kDa) no se afectaron cuando los ensayos se realizaron en presencia de cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+}) y en estas condiciones no se detectó actividad de otras nucleasas adicionales (Figura 47.A). Estas mismas muestras se sometieron a un tratamiento con EDTA previo al desarrollo de la actividad a pH neutro, que provocó una inhibición total de las nucleasas descritas anteriormente. La inclusión de Zn^{2+} consiguió revertir la actividad de ambas nucleasas de 34 y 39 kDa (Figura 47.B).

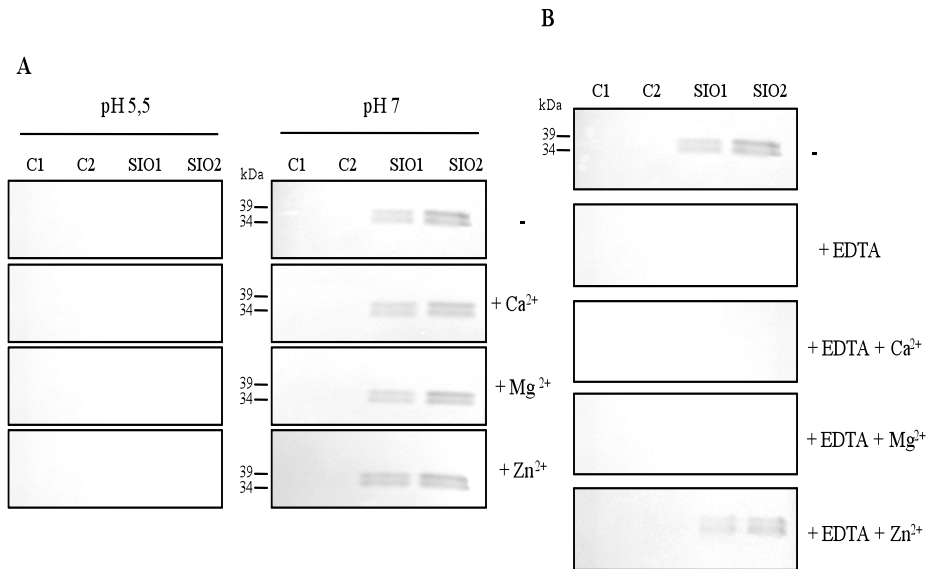


Figura 47. Efecto de cationes y del EDTA en la actividad nucleasa de hojas senescentes. En las mismas muestras indicadas en la Figura 45 y 46 se determinó: **(A)** Actividad nucleasa específica a los valores de pH indicados en ausencia (-) o en presencia de los indicados a una concentración final de 0,1 mM. **(B)** Actividad nucleasa determinada a pH 7 tras incubación de los geles previamente 1 h con 1 mM EDTA (+EDTA), en ausencia (-) y presencia de cationes (Ca²⁺, Mg²⁺ y Zn²⁺) a una concentración final de 5 mM.

La actividad nucleasa específica se analizó en hojas senescentes sometidas a senescencia inducida por oscuridad (SIO1) utilizando ARN y ADNbc como sustratos (Figura 48). Cuando se determinó la actividad con ARN como sustrato se detectaron dos ribonucleasas de masas moleculares 20 y 14 kDa, respectivamente sólo cuando el ensayo se realizó a pH ácido (Figura 48.A). La presencia de cationes no favoreció la detección de otras ribonucleasas diferentes a éstas, aunque en presencia de Zn²⁺ se inhibió la actividad de ambas (Figura 48.A). A pH neutro estas ribonucleasas no se detectaron, pero sí lo hicieron las dos nucleasas de 39 y 34 kDa, observadas en la Figura 48.A. Cuando se utilizó ADNbc como sustrato y sólo cuando se realizó a pH neutro e incubando durante más tiempo se detectaron dos nucleasas de masas moleculares 34 y 39 kDa, respectivamente. A pH ácido estas nucleasas sólo se detectaron cuando se adicionó Zn²⁺ al ensayo (Figura 48.B).

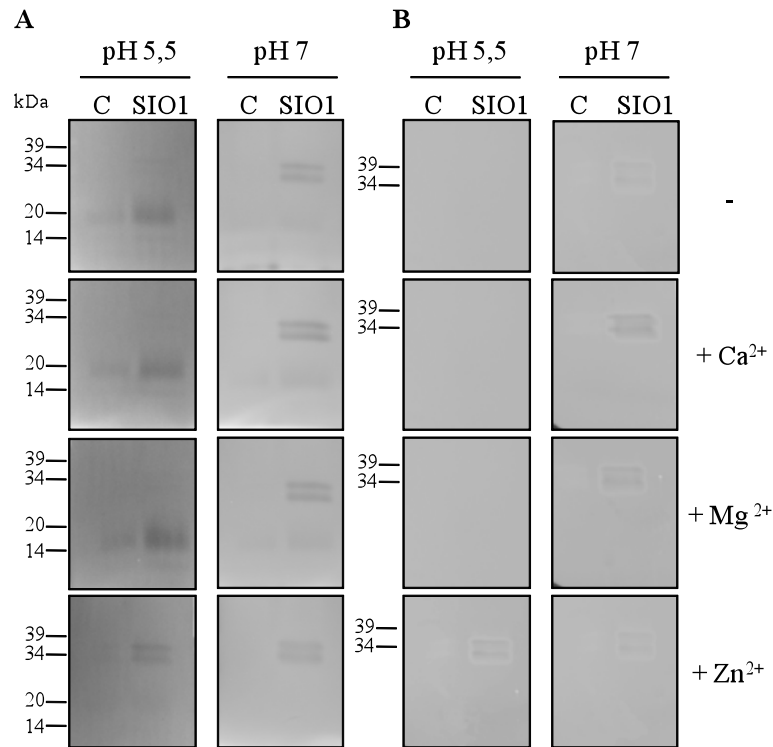


Figura 48. Actividades nucleasas en hojas senescentes de judía con ARN o ADNbc como sustratos. La actividad nucleasa se determinó en extractos crudos obtenidos de hojas de judía de 45 días. El ensayo se realizó a los valores de pH indicados y en ausencia (-) o presencia de los cationes indicados a una concentración final de 0,1 mM. Los sustratos fueron ARN (A) y ADNbc (B), desarrollando la actividad durante 20 y 60 min respectivamente.

En las hojas sometidas a senescencia inducida por oscuridad también se analizó la expresión de los miembros de la familia S1/P1. El gen *PVN2* se expresó en todas las hojas aunque ésta fue mayor en hojas en las que se indujo la senescencia por oscuridad (Figura 49). La expresión del gen *PVN5* también incrementó significativamente en hojas senescentes, siendo dicho incremento mayor en las sometidas a senescencia sin separarse de la planta.

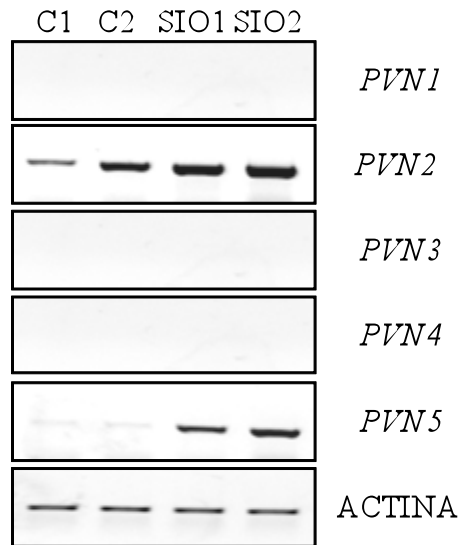


Figura 49. Expresión de la familia S1/P1 nucleasa en hojas de judía en las que se ha inducido la senescencia por oscuridad. El análisis de la expresión de la familia S1/P1 se llevó a cabo en las mismas muestras indicadas en la figura 4.14, mediante RT-PCR , utilizando un programa de PCR de 25 ciclos para la actina y 27 para las nucleasas.

CAPÍTULO 5.

**ACTIVIDAD NUCLEASA Y ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS
NUCLEASAS DE LA FAMILIA S1/P1 DURANTE LA SENESCENCIA
DE COTILEDONES**

5.1. Movilización de reservas en cotiledones desde la imbibición hasta la senescencia

La evolución del nivel de diferentes parámetros relacionados con la movilización de reservas en cotiledones se estudió desde el momento de la imbibición hasta el desarrollo de la senescencia (Figura 50). La cantidad de globulinas en cotiledones se mantuvo constante hasta el 4 DDI (Figura 50.A). La faseolina, con masa molecular de aproximadamente 45 kDa, fue la globulina mayoritaria en judía (Figura 50.A). A partir del 4 DDI las globulinas comenzaron a descender progresivamente hasta desaparecer en el día 11 de desarrollo. El peso fresco de los cotiledones incrementó tras el inicio de la imbibición hasta alcanzar su máximo a los 4 DDI, momento a partir del cual comenzó a descender (Figura 50.B). La concentración de ureidos totales y de aminoácidos libres totales descendieron durante la germinación debido fundamentalmente al incremento del peso fresco y aumentaron ligeramente tras la germinación entre el 4 y 7 DDI. La concentración de ambos compuestos descendió fuertemente en el día 11 DDI (Figura 50 C y D). El descenso que se produce a partir de los 7 DDI en todos los parámetros analizados es consecuencia de la movilización de las diferentes reservas de nitrógeno marcando el desarrollo de la senescencia en los cotiledones.

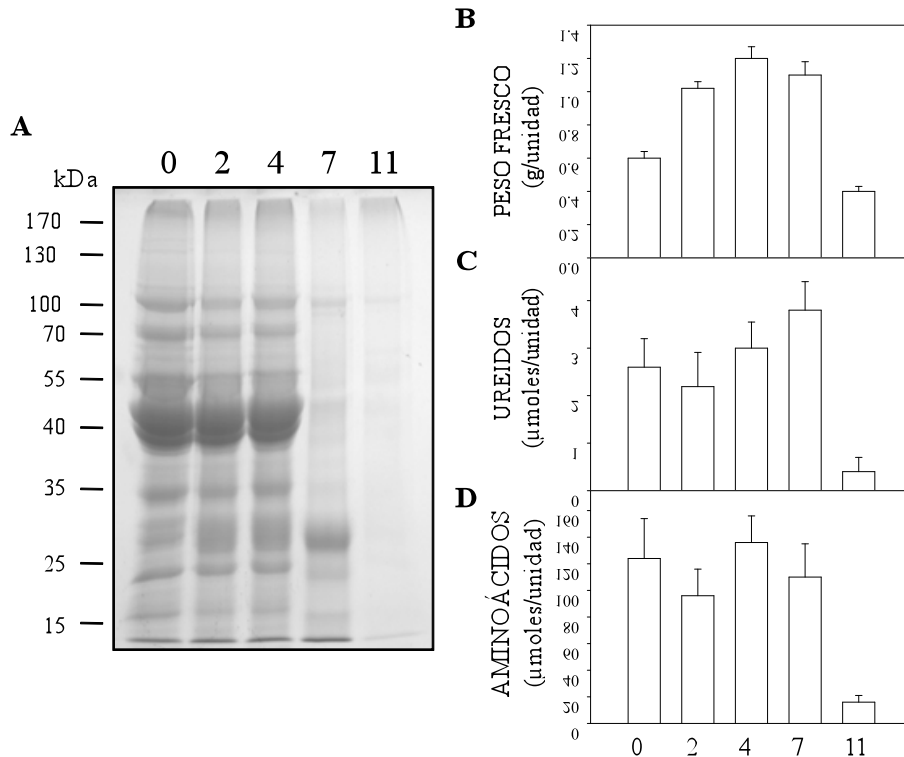


Figura 50. Parámetros asociados a senescencia en cotiledones desde la imbibición hasta el desarrollo de la senescencia. En cotiledones de plántulas a los días indicados desde el inicio de la imbibición se determinó: **A)** Cantidad de las globulinas, **B)** Peso fresco, **C)** Concentración de ureidos totales, **D)** Concentración de aminoácidos libres. Los datos se expresan por unidad, correspondiendo a la pareja cotiledones.

5.2. Nucleasas involucradas en la senescencia de cotiledones

La actividad nucleasa se determinó en cotiledones de plántulas de judía en el intervalo comprendido entre 4 y 11 DDI. El ensayo de la actividad nucleasa en gel se llevó a cabo a pH ácido y neutro en diferentes condiciones (Figura 51). En cotiledones a partir del 4 DDI, tanto a pH ácido como neutro, se detectó una nucleasa de 37 kDa. Dicha nucleasa, por sus principales características enzimáticas, podría ser la misma detectada en ejes. Esta actividad desapareció conforme se fueron desarrollando los cotiledones, mientras que comenzaron a distinguirse diferentes proteínas con actividad nucleasa y cuyas intensidades incrementaron hasta alcanzar el máximo a los 11 DDI, coincidiendo con la

senescencia de los cotiledones (Figura 51). Estas nucleasas tenían masas moleculares de 42, 35 y 32 kDa y presentaron mayor actividad a pH neutro.

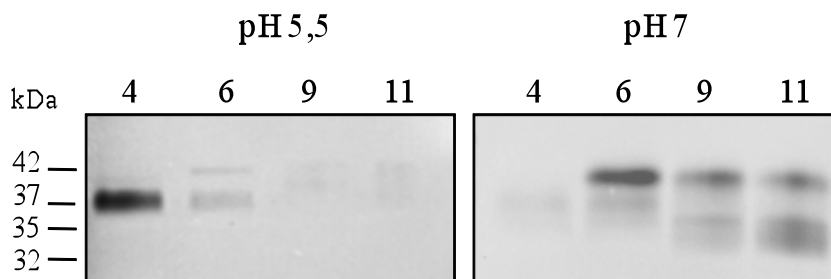


Figura 51. Actividad nucleasa durante el desarrollo de cotiledones. La actividad nucleasa se determinó a pH ácido (5,5) y neutro (7) y en ausencia de cationes en extractos crudos obtenidos de cotiledones recogidos a los días indicados tras el inicio de la imbibición (DDI). A la izquierda de la figura se indican las masas moleculares (kDa) de las diferentes nucleasas.

El efecto de los cationes sobre las actividades nucleasas se realizó con extractos obtenidos de cotiledones de 11 DDI por ser el momento de máxima actividad de las nucleasas. Se consiguió una mejor separación electroforética de las nucleasas de cotiledones al realizar los ensayos en geles de acrilamida al 8,5 %. El ensayo realizado en presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} , tanto a pH ácido como neutro, no favoreció la inducción de una nueva actividad distinta a las descritas anteriormente (Figura 52.A). La inclusión de Zn^{2+} provocó la inhibición en las nucleasas de masas moleculares de 42, 35 y 32 kDa a pH neutro. El tratamiento con EDTA provocó la inhibición total de todas las nucleasas, por lo que son todas metaloenzimas (Figura 52.B). Únicamente los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , consiguieron recuperar la actividad enzimática tras el tratamiento con EDTA (Figura 52.B).

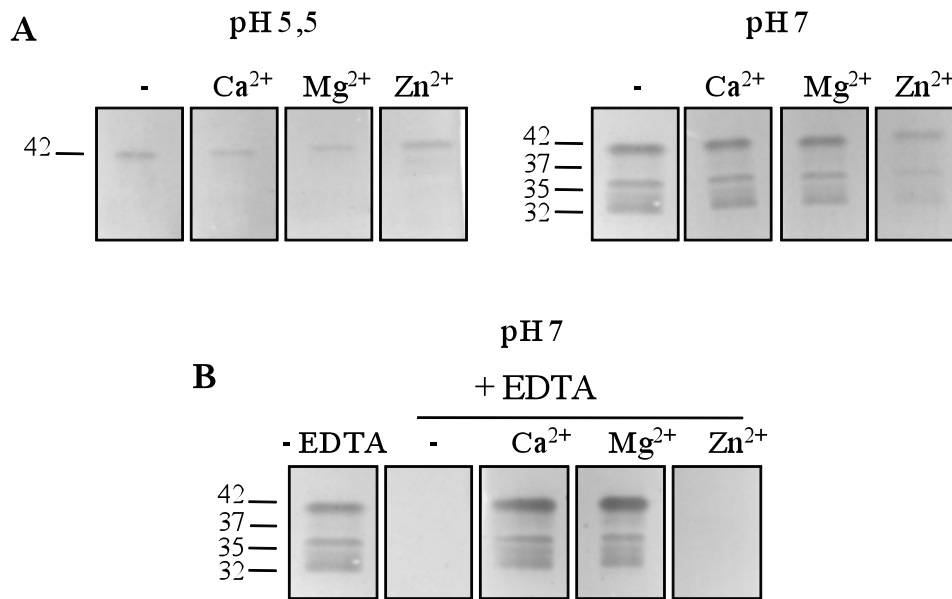


Figura 52. Actividad nucleasa en cotiledones en presencia de cationes y EDTA. En extracto crudo de cotiledones a los 11 DDI se determinó: **A)** La actividad nucleasa específica a los valores de pH indicados en ausencia (-) y presencia de los cationes indicados a una concentración final de 0,1 mM. **B)** Actividad nucleasa específica a pH 7 en ausencia (-EDTA) o en presencia de EDTA 1 mM (+EDTA) y el catión indicado a una concentración final de 5 mM. A la izquierda de la figura se indican las masas moleculares (kDa) de las diferentes nucleasas.

Se analizó la presencia de otras posibles nucleasas de cotiledones durante la senescencia que pudiesen hidrolizar ADNbc o ARN (Figura 53). Cuando se utilizó ARN como sustrato se detectaron dos proteínas de 15 y 17 kDa con actividad desde el 4DDI que incrementó a lo largo del desarrollo de la senescencia. Estas ribonucleasas mostraron el mismo nivel de actividad a pH ácido o neutro, y se inhibieron ligeramente en presencia de Zn²⁺ (Figura 53.A). También se detectó la actividad de otras proteínas con masas moleculares similares a las descritas con ADNmc como sustrato, de 37 y 42 kDa. Concretamente la proteína de 37 kDa mostró actividad ribonucleasa en cotiledones de 4 y 7 DDI cuando el ensayo se realizó a pH ácido en presencia de Zn²⁺. La proteína de 42 kDa se detectó en los extractos de 11 DDI cuando el ensayo se realizó a pH neutro y su actividad se inhibió en presencia de Zn²⁺

(Figura 53.A). Cuando la actividad se determinó utilizando ADNbc como sustrato únicamente se detectó actividad de una proteína de 42 kDa en cotiledones de 11 días, tanto a pH ácido como neutro la cual se inhibió en presencia de Zn^{2+} (Figura 53.B). Probablemente, la proteína de 42 kDa sea la misma que es capaz de digerir ácidos nucleicos de cadena simple y de doble cadena. Las nucleasas que se inducen durante el desarrollo de cotiledones son glicoproteínas ya que el tratamiento con concanavalina-A inhibió su actividad por completo (Figura 54).

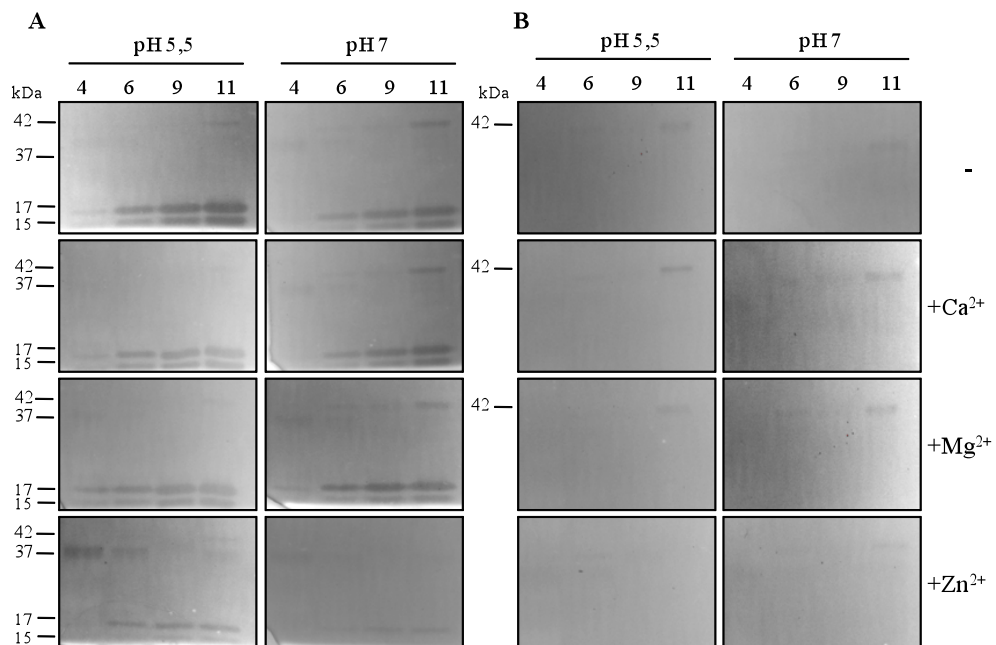


Figura 53. Actividades nucleasas en cotiledones de judía con ARN o ADNbc como sustratos. La actividad nucleasa se determinó en extractos crudos obtenidos de cotiledones a los DDI indicados, realizando el ensayo a los valores de pH indicados y en ausencia (-) o presencia de los cationes indicados a una concentración final de 0,1 mM, utilizando como sustrato ARN (A) y ADNbc (B). A la izquierda de la figura se indican las masas moleculares (kDa) de las diferentes nucleasas.

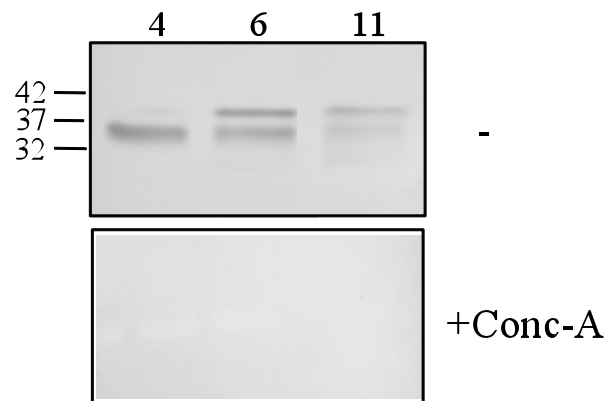


Figura 54. Efecto de la concanavalina-A en las nucleasas de cotiledones. El extracto crudo de las muestras de la Figura 5.3 y 5.4 se incubó 1 h a temperatura ambiente en ausencia (-) y en presencia de concanavalina-A (+Conc.A) y posteriormente se determinó la actividad nucleasa a pH 7. A la izquierda de la figura se indican las masas moleculares (kDa) de las diferentes nucleasas.

5.3. Expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 durante el desarrollo de cotiledones

La expresión de los miembros de la familia nucleasas S1/P1 de judía se analizó en cotiledones desde el inicio de la imbibición hasta el desarrollo de la senescencia (Figura 55). En los primeros estadios del desarrollo (4 y 6 DDI) sólo se observó expresión de *PVNI*. En los siguientes estadios, la expresión *PVNI* se redujo por completo y coincidiendo con el desarrollo de la senescencia (9 y 11 DDI) comenzaron a expresarse otros genes de la familia como *PVN4* y *PVN5* (Figura 55).

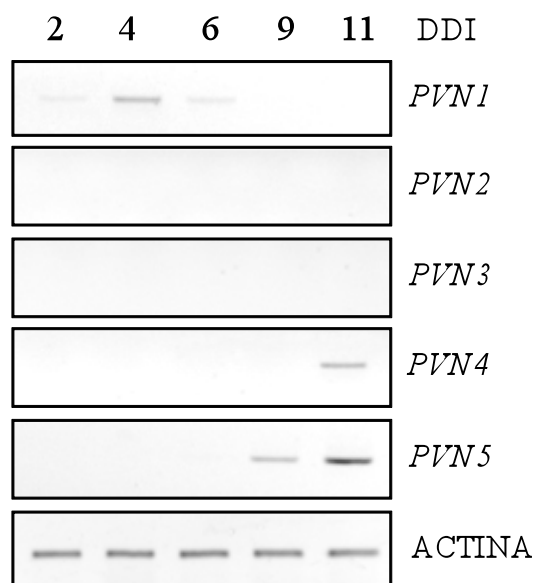


Figura 55. Expresión de la familia S1/P1 nucleasas en cotiledones. El análisis de la expresión se llevó a cabo mediante RT-PCR en cotiledones a los DDI indicados. El programa de PCR fue 25 ciclos para la actina y 27 para las nucleasas.

5.4. Efecto del rejuvenecimiento de cotiledones en las nucleasas

El rejuvenecimiento de los cotiledones se llevó a cabo eliminando el epicotilo a plántulas de 7 DDI y analizando los distintos parámetros relacionados con la movilización de las reservas (Figura 56). En las plántulas sin epicotilo se produjo una ralentización en la movilización de las reservas al interrumpirse temporalmente la demanda de nutrientes mientras se desarrolla un nuevo epicotilo (Figura 56). El rejuvenecimiento de los cotiledones provocó una menor degradación de las globulinas (Figura 56.B). Mientras que en cotiledones de plántulas a las 11 DDI, las globulinas se habían degradado casi por completo, en los cotiledones rejuvenecidos aún se detectó la presencia de la faseolina (Figura 56.B). El desarrollo del proceso de senescencia provoca un descenso importante del peso fresco en los cotiledones, entre los 7 y 11 DDI, sin embargo en los cotiledones rejuvenecidos esta pérdida fue mucho menor (Figura 56.C). También se observó una menor movilización de los compuestos

nitrogenados en los cotiledones rejuvenecidos como reflejaron las concentraciones en proteína soluble y ureidos totales (Figura 56 D y E).

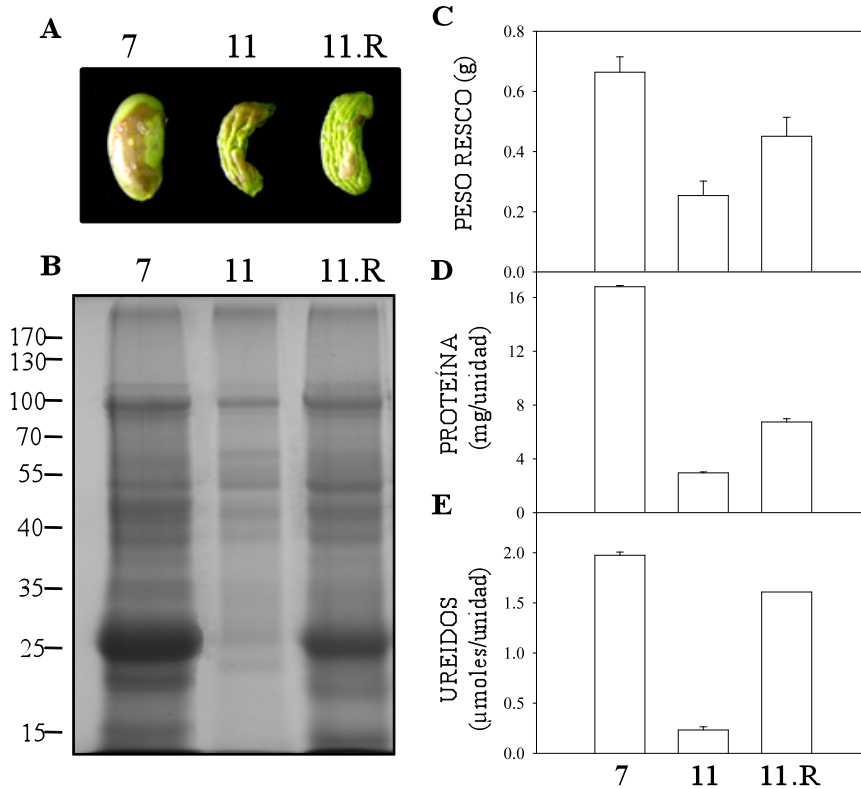


Figura 56. Efecto del rejuvenecimiento en cotiledones. Plántulas a los 7 DDI se les eliminó el epicotilo a plántulas de judía y se analizaron al 11 DDI (11.R) junto con cotiledones de plántulas desarrolladas en condiciones estándar a los 7 DDI (7) y 11 DDI (11). **A)** Fotografía de los cotiledones analizados. **B)** Cantidad de globulinas. **C)** Peso fresco, **D)** Concentración de proteína soluble y **E)** Concentración de ureidos totales. Los datos se expresan por unidad, correspondiendo a la pareja cotiledones.

La actividad nucleasa en los extractos crudos de estos cotiledones sugirió una relación directa con su estado de senescencia (Figura 57). Mientras que en cotiledones de 11 DDI se detectaba la actividad de tres nucleasas mayoritarias, en los cotiledones rejuvenecidos la actividad nucleasa fue menor observándose principalmente las proteínas de 32 y 35 kDa (Figura 57.A). El análisis de la expresión de las nucleasas de la familia S1/P1 en estos cotiledones mostró que

su rejuvenecimiento provocó un descenso en la expresión de *PVN4* y *PVN5* (Figura 57.B).

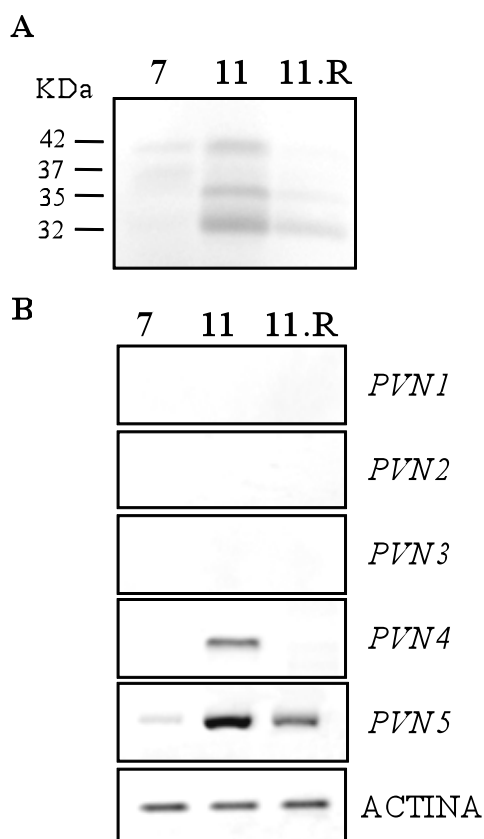


Figura 57. Efecto del rejuvenecimiento de cotiledones sobre la actividad nucleasa y expresión de nucleasas. En las muestras de la Figura 5.7 se determinó: **A)** La actividad nucleasa específica a pH 7. El gel se preparó al 8,5% de acrilamida. A la izquierda de la figura se indican las masas moleculares (kDa) de las diferentes nucleasas. **B)** Expresión de los genes de la familia S1/P1 nucleasas en cotiledones. El análisis de la expresión se llevó a cabo mediante RT-PCR. El programa de PCR fue de 25 ciclos para la actina y 27 para las nucleasas.

5.5. Efecto de la deficiencia de nutrientes sobre las nucleasas de cotiledones

Se analizaron cotiledones procedentes de plántulas de 8 DDI desarrolladas en medio hidropónico en condiciones estándar así como de plántulas regadas con solución carente de nitrato y fosfato. En los cotiledones de plántulas con déficit de nutrientes se observó un descenso en la cantidad de globulinas (Figura 58.A). También fue menor el peso fresco (Figura 58.B), la concentración de

proteína soluble total (Figura 58.C) y la de ureidos totales (Figura 58.D). Estos parámetros reflejan un aumento en la velocidad de la movilización de las sustancias de reserva como consecuencia de la carencia en los nutrientes necesarios para el crecimiento de la plántula.

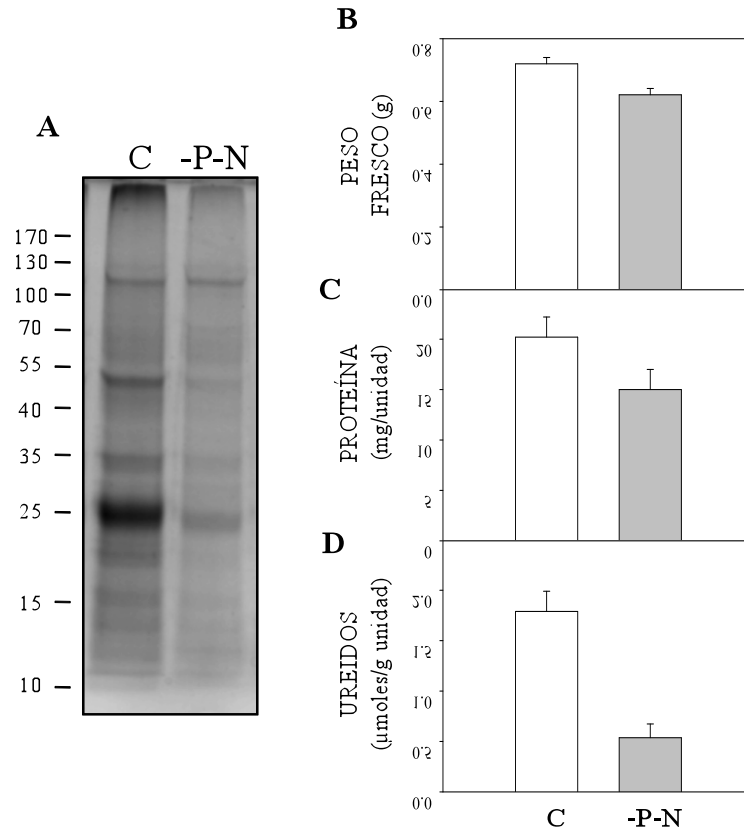


Figura 58. Efecto de la deficiencia de nutrientes en cotiledones. En cotiledones de plántulas de 8 DDI desarrolladas en condiciones estándar (C) o en ausencia de nitrato y fosfato (-P-N) se determinó: **A)** Cantidad de globulinas, **B)** Peso fresco, **C)** Concentración de proteína soluble y **D)** Concentración de ureidos totales. Los datos se expresan por unidad, correspondiendo a la pareja cotiledones.

La actividad nucleasa incrementó significativamente en los cotiledones con déficit de nutrientes, correspondiéndose a las mismas proteínas con actividad nucleasa descritas anteriormente (Figura 59.A). La carencia de nutrientes no causó la inducción de otras nucleasas a las descritas anteriormente en condiciones estándar. El análisis de la expresión de genes de la familia S1/P1

reveló, una mayor expresión de *PVN5* y así como inducción de *PVN4* en los cotiledones de plántulas con déficit de nutrientes (Figura 59.B).

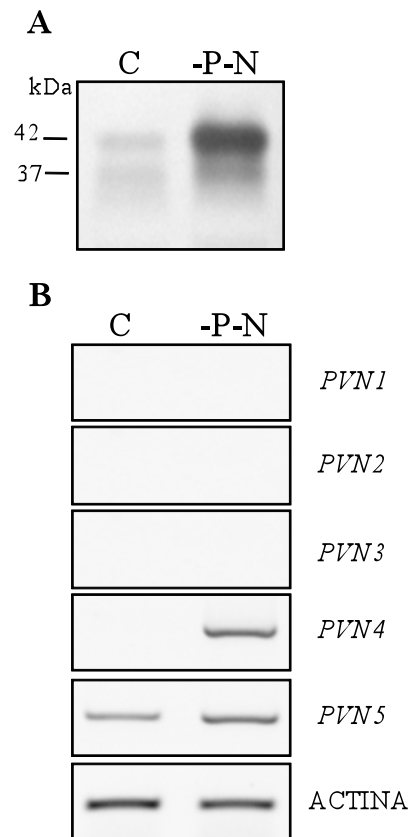


Figura 59. Actividad nucleasas y expresión de la familia S1/P1 en cotiledones de plántulas con déficit de nutrientes. En las mismas muestras de la Figura 58 se determinó: **A)** La actividad nucleasa específica a pH 7 en SDS PAGE al 8,5 % de acrilamida. A la izquierda de la figura se indican las masas moleculares (kDa) de las diferentes nucleasas. **B)** Expresión de la familia S1/P1 nucleasas mediante RT-PCR, con un programa de PCR de 25 ciclos para estudiar la actina y 27 para las nucleasas.

CAPÍTULO 6.

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA NUCLEASA *PVN2* EN *E. COLI*

6.1. Expresión del gen de la nucleasa *PVN2* en *E.coli*

La secuencia codificante del ADNc de *PVN2* se amplificó por PCR usando como molde el ADNc de las primeras hojas trifoliadas en estado de senescencia avanzado. El producto de amplificación con un tamaño aproximado de 885 Kb se purificó a partir de un gel de agarosa tras su electroforesis. Éste se insertó en el vector de clonación pSpark y dicho plásmido se amplificó en células DH5 α de *E.coli*. El gen *PVN2*, gracias a los sitios de corte para enzimas de restricción introducidos por los cebadores en ambos, se introdujo en el plásmido pET-30b (+) en la fase de lectura adecuada. Finalmente con esta construcción se transformaron células BL21 de *E.coli*.

Las células BL21 de *E.coli* transformadas se indujeron con IPTG 1mM y la sobreexpresión de la proteína recombinante Hys-PVN2 se estudió gracias a la cola de histidinas añadida en su extremo terminal. La proteína recombinante no se detectó en las células no transformadas ni en las células transformadas sin inducir (Figura 60). Cuando la inducción se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C generó la suficiente proteína recombinante para su purificación, aunque también sufría un mayor proceso de proteólisis y, que se detectan mediante Western como aquellas bandas de menor tamaño. La cantidad de proteína recombinante no aumentó a partir de las 2 horas de inducción con IPTG (Figura 60.B). La proteína recombinante no mostró actividad ni en gel ni *in vitro*, ni bajo diferentes condiciones de ensayo.

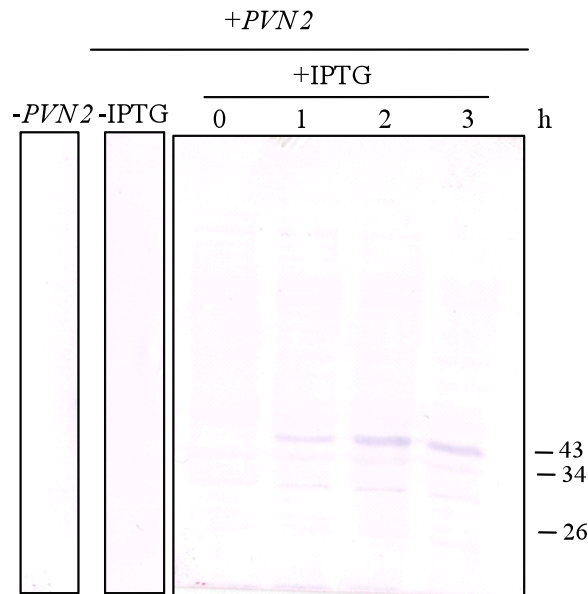


Figura 60. Sobreexpresión de la proteína recombinante Hys-PVN2 en *E.coli*. La suspensión de diferentes cultivos de bacterias (15 μ l) se mezcló directamente con tampón de carga (10 μ l) que contenía β -Mercaptoetanol y tras hervir, la expresión de la proteína Hys-PVN2 se analizó mediante la técnica Western blot utilizando anticuerpos antihistidinas. En las diferentes calles del gel de acrilamida al 8,5% se analizaron extractos procedentes de: bacterias sin transformar (-PVN2), bacterias transformadas con la construcción PVN2-pET sin inducir con IPTG (-IPTG) o inducidas con IPTG 1 mM a 37 °C, a los tiempos indicados (h: horas). A la izquierda de la figura se indican algunos marcadores de masa molecular (kDa).

6.2. Purificación de la proteína recombinante

La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía en una columna de afinidad cargada con Ni^{2+} en condiciones no desnaturizantes y desnaturizantes. Cuando se realizó la purificación en condiciones no desnaturizantes, la mayor parte de la proteína recombinante se obtuvo en cuerpos de inclusión formando parte del homogenado resultante tras romper las células (calle P, Figura 61). El sobrenadante constituyó el extracto crudo que se aplicó a la cromatografía de afinidad. La cantidad de proteína que se retuvo en la columna fue muy baja y ésta se eluyó tras un lavado con imidazol 100 mM. La poca cantidad de proteína eluida hizo necesario aumentar el tiempo de revelado (calle E.II, Figura 61).

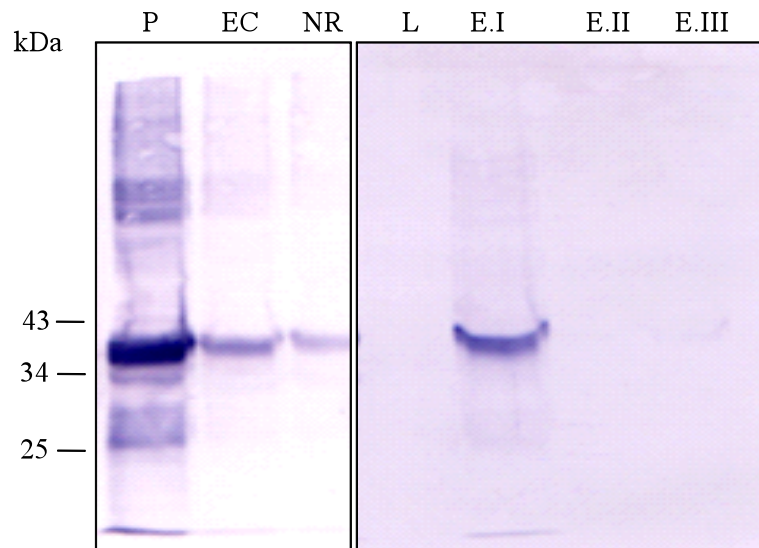


Figura 61. Purificación de la proteína recombinante Hys-PVN2 en condiciones no desnaturizantes. El cultivo de bacterias que contenía la construcción PVN2-pET se indujo con IPTG 1 mM durante 2 horas a 37 °C. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis en ausencia de agentes desnaturizantes. Las células se rompieron por sonicación y el homogenado se centrifugó separándose en precipitado (P) y sobrenadante (EC). El sobrenadante se aplicó a una columna de afinidad cargada con Ni^{2+} y la presencia de la proteína recombinante se analizó mediante la técnica Western blot tanto en el precipitado (P) como en las diferentes las fracciones obtenidas de la purificación (EC, NR: fracción no retenida en la columna), lavado sin imidazol (L) y lavados con imidazol en diferentes concentraciones E.I (0 mM), E.II y E.III (100 mM), E.IV (200 mM). A la izquierda de la figura se indican algunos marcadores de masa molecular (kDa).

La purificación bajo condiciones desnaturizantes se llevó a cabo en presencia de urea en una concentración de 6 y 8 M (Figura 62). En ningún caso la proteína recombinante mostró actividad nucleasa. Como se puede observar en el Western blot la cantidad de proteína que se detectó en el pellet fue menor cuando se usó 8 M de urea (Figura 62.B). Sin embargo, a pesar de utilizar una alta concentración de urea, gran parte de la proteína recombinante aún quedaba formando parte del precipitado del cultivo y la presente en el extracto crudo no quedaba retenida por completo en la columna. No obstante, la fracción de proteína eluida tras su diálisis en tampón salino, resultó suficiente para alcanzar

la homeogeneidad electroforética (Figura 63) y detectarla mediante SDS-PAGE (8,5%) en condiciones reductoras y tinción coomassie de un solo paso. La proteína recombinante presentó una masa molecular de 42 kDa (Figura 63). Esta proteína purificada con 42 kDa, se podrá emplear para la obtención de anticuerpos para PVN2 de judía y por tanto, permitirá llevar a cabo un análisis en mayor complejidad de su expresión en la planta.

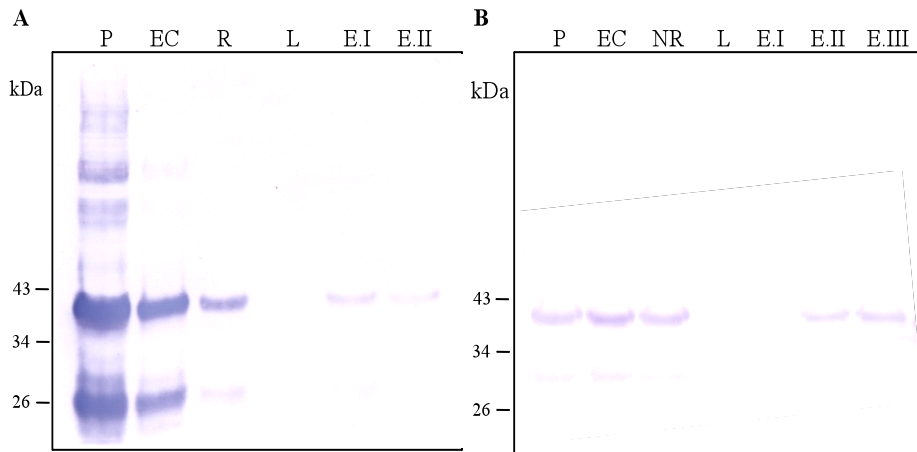


Figura 62. Purificación de la proteína recombinante Hys-PVN2 en condiciones desnaturalizantes. El cultivo de bacterias que contenía la construcción *PVN2*-pET se indujo con IPTG 1 mM durante 2 horas a 37 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis en presencia de urea y se rompieron por sonicación. Tras centrifugar se separó la fracción precipitada (P) del sobrenadante (EC). El sobrenadante se aplicó a una columna de afinidad cargada con Ni²⁺ y la presencia de la proteína recombinante se analizó mediante la técnica Western blot. **A)** Purificación en presencia de urea 6 M. Las fracciones analizadas fueron: precipitado (P) y sobrenadante (EC), fracción no retenida en la columna (NR), y lavado sin imidazol (L) y lavados con imidazol (E.I y E.II) en concentraciones 100 y 200 mM respectivamente. **B)** Purificación en presencia de urea 8 M. Las fracciones analizadas fueron: precipitado (P) y sobrenadante (EC), fracción no retenida en la columna (NR), lavado sin imidazol (L) y lavados con imidazol (E.I, E.II, E.III) en concentraciones 75, 100 y 200 mM respectivamente. A la izquierda de la figura se indican algunos marcadores de masa molecular (kDa).

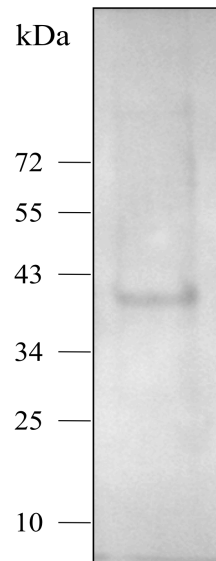


Figura 63. Análisis mediante SDS-PAGE de la proteína recombinante Hys-PVN2 purificada. La proteína purificada en condiciones desnaturalizantes se sometió a diálisis frente a un tampón salino y se resolvió mediante SDS-PAGE (8,5%) en condiciones reductoras. El gel se tiñó con coomassie de un solo paso. A la izquierda de la figura se indican algunos marcadores de masa molecular (kDa).

IV. DISCUSIÓN

1. Estudio y purificación de una proteína con actividad nucleasa en ejes embrionarios de judía.

La judía, es una leguminosa que posee la capacidad de asociarse con bacterias desarrollando en sus raíces nódulos, unas estructuras que les permiten fijar el nitrógeno atmosférico reduciéndolo hasta amonio. En el caso de judía, así como las demás leguminosas ureídicas, este amonio se incorpora a esqueletos carbonatados a través de una compleja ruta biosintética que termina con la síntesis de los ureidos. Estos compuestos se transportan a las diferentes partes de la planta distribuyendo así el nitrógeno. Los ureidos tienen una relación N:C mayor que las amidas y su utilización puede suponer una adaptación a la tolerancia a la sequía al poder cerrar los estomas para conservar el agua, puesto que precisan de menos fotosintatos para transportar el nitrógeno (Revisado en Todd *et al.* 2006)

Los ureidos también podrían suponer una ventaja adaptativa en cuanto al transporte de nitrógeno en otras condiciones fisiológicas. Así, durante la germinación y desarrollo postgerminativo de judía se ha descrito acumulación de ureidos e inducción de las enzimas que los degradan (Quiles *et al.* 2009). Estos ureidos proceden de la degradación de los nucleótidos de purinas (Quiles *et al.* 2009). La implicación del metabolismo de los nucleótidos durante el desarrollo postgerminativo de judía también se deduce por la inducción de una fosfatasa en ejes de judía con elevada afinidad por los nucleótidos y cuyo patrón de actividad coincide con el de la inducción del metabolismo de ureidos (Cabello-Díaz *et al.* 2012). La posibilidad de que estos nucleótidos y las purinas procedan del reciclaje en lugar de ser sintetizados *de novo* supondría un beneficio durante la germinación, cuando existe una gran demanda de estos elementos por parte del embrión. El origen de estos compuestos podría ser la degradación de los ácidos nucleicos (Zrenner *et al.* 2006). Este hecho atribuye una ventaja a especies que poseen un gran genoma o a especies que almacenan

ácidos nucleicos durante la formación de la semilla mediante los procesos de endorreducción. Durante el desarrollo de la semilla en *P. vulgaris* la proporción de núcleos endopoliploides en los cotiledones aumenta progresivamente hasta alcanzar en su madurez un ADN con 128C (C es el contenido de ADN de un genoma haploide con un número n de cromosomas). La endorreducción en leguminosas parece estar asociada con el tipo de cotiledones (Rewers y Sliwinska 2012). Los cotiledones en los que predomina la función de reserva acumulan copias de genoma, mientras que este proceso es menos importante en los cotiledones con una función foliar. El patrón de endorreducción en cotiledones depende de la especie, aunque dentro de cada una se ha sugerido como marcador de madurez de la semilla (Rewers y Sliwinska 2012). En los ejes también se produce endorreducción, aunque durante el desarrollo de ejes embrionarios sólo se produce un endociclo originando núcleos con un ADN con 8C (Rewers y Sliwinska 2012).

Recientemente se ha descrito que en especies polisomáticas la intensidad de la endorreducción durante la germinación y el desarrollo de la plántula se produce de forma diferente a lo largo del eje embrionario y que, además, varía con la especie y con el tipo de emergencia de la plántula (Rewers y Sliwinska 2014). En especies epigeas, como la judía, la intensidad de la endorreducción es mayor en la zona de transición entre la radícula y el hipocotilo, mientras que en las hipogreas se produce en el hipocotilo (Rewers y Sliwinska 2014). Los ácidos nucleicos también se acumulan en semillas en forma de ARN para utilizarse en la síntesis de proteínas durante los primeros momentos en la germinación (Bewley 1997), pero también podrían actuar como reservorio de nutrientes cuando este ARN almacenado es degradado.

Las actividades que catalizan la degradación de ácidos nucleicos se han determinado a lo largo de la germinación y desarrollo postgerminativo en ejes

y cotiledones de judía mediante ensayo *in vitro* y en gel. La principal ventaja que tiene el ensayo en gel es que permite identificar el número y la masa molecular aparente de las proteínas con actividad nucleasa presentes en cada tejido. El ensayo en gel es el método más ampliamente utilizado para determinar las actividades nucleasas en extractos de plantas. No obstante, este método se lleva a cabo en condiciones parcialmente desnaturalizantes lo que podría afectar a la actividad de algunas enzimas impidiendo su detección. Además, la electroforesis puede hacer que las nucleasas se separen de otras proteínas o de cofactores necesarios para su actividad. Por tanto, la mayor parte de los ensayos se realizan de forma habitual en presencia de diversos cationes.

En ejes en desarrollo de judía hay una nucleasa mayoritaria de 37 kDa que muestra actividad a partir de la emergencia radicular, mientras que en los cotiledones la inducción es posterior. Este patrón de actividad coincide con los parámetros relacionados con el metabolismo de nucleótidos analizados en judía (Quiles *et al.* 2009; Cabello-Díaz *et al.* 2012) así como con la movilización de las proteínas de reserva (Tiedemann *et al.* 2000). Éstas se movilizan primero en ejes y, tras agotarse, empiezan a moverse en cotiledones. En judía hay una relación entre la hidrólisis de ácidos nucleicos y la acumulación de ureidos durante la germinación y el desarrollo postgerminativo, aunque esta relación no se observa en todas las leguminosas analizadas.

Otras características de esta enzima son una gran estabilidad térmica, elevada temperatura óptima, naturaleza glicoproteica y se trata de una metaloenzima. El catión Zn^{2+} recupera la actividad de la enzima tras su inhibición por EDTA indicando que éste podría ser el cofactor o bien que está implicado en su conformación estructural. No obstante, la enzima se inhibe por elevadas concentraciones de Zn^{2+} en la mezcla de reacción. Esto mismo se ha observado en ENDO2, una nucleasa Zn^{2+} -dependiente (Ko *et al.* 2012). El pH del núcleo

y del citoplasma de células jóvenes y maduras es neutro (alrededor de 7,5) y existe una baja concentración de los iones Ca^{2+} y Zn^{2+} . Por el contrario, se ha descrito una alta concentración de Zn^{2+} en el interior de vacuolas y de Ca^{2+} en el apoplasto, ambos con pH ácido (alrededor de 5,5) (Martín *et al.* 1982). Al final del proceso de MCP se produce la ruptura del tonoplasto y la vacuola libera su contenido produciéndose una acidificación del citoplasma y un incremento en la concentración de iones (Hara-Nishimura y Hatsugai 2011). Se puede asumir que durante la MCP las nucleasas $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependientes participarían en la fase inicial del proceso y que serían dirigidas al núcleo y en la última fase participarían las Zn^{2+} -dependientes (Sugiyama *et al.* 2000).

La proteína de 37 kDa se ha purificado hasta la homogeneidad electroforética a partir de ejes completos de plántulas de judía de 5 días con un factor de purificación final de 743 y un rendimiento del 11%. Este factor de purificación sugiere que la nucleasa podría representar el 0,13% de la proteína total presente en el extracto crudo de ejes de judía de 5 días. Por la alta termoestabilidad de esta proteína, el tratamiento térmico en presencia de Zn^{2+} se ha utilizado con paso de purificación. Su naturaleza glicoproteica le permite unirse de forma reversible a la concanavalina-A, lo que también ha sido utilizado como paso de purificación. El número de nucleasas purificadas a partir de plantas es muy reducido y sólo algunas han sido purificadas a partir de plántulas como en alfalfa (Yupsanis *et al.* 1996), agropiro alargado (Yupsanis *et al.* 2004) o soja verde y guisante (Rasheed 2006).

La proteína purificada es un monómero que probablemente tenga puentes disulfuro intracatenarios. La mayoría de las nucleasas de plantas son también monocatenarias (Desai y Shankar 2003) aunque en frijol (Laskowski 1980) y semillas de guisante (Naseem y Hadi 1987) están constituidas por dos subunidades diferentes de 25 y 15 kDa y 30 y 24 kDa respectivamente. La

actividad de la proteína pura *in vitro* no se afecta por la inclusión de SDS, por lo que se eligió el ensayo en gel para determinar la actividad en extractos crudos. El ensayo *in vitro* se ha utilizado para confirmar las características enzimáticas de la proteína pura determinadas previamente mediante ensayo en gel. Las características de la enzima indican que sería miembro de la familia de las nucleasas tipo I (Sugiyama *et al.* 2000). Entre las nucleasas de este tipo descritas en plantas se encuentra la nucleasa I, que fue la primera que se caracterizó a partir de *Vigna radia* (Johnson y Laskowski 1968) y da el nombre a este grupo, BEN1 de cebada (Aoyagi *et al.* 1998), BFN1 de *Arabidopsis* (Pérez-Amador *et al.* 2000) y ZEN1 de *Zinia elegans* (Ito y Fukuda 2002).

La nucleasa purificada es la proteína mayoritaria con actividad nucleasa en ejes completos de judía en las distintas condiciones de ensayo (pH y presencia de varios cationes divalentes). Esto estaría en contradicción con la implicación de varias nucleasas con distintas funciones durante la germinación. En el gametofito de *Picea glauca*, tras la germinación y durante el desarrollo postgerminativo de la plántula, se inducen hasta nueve nucleasas con características catalíticas y un patrón temporal de inducción diferentes (He y Kermode 2003). En semillas de alfalfa se inducen tras la germinación dos endonucleasas, una ácida y otra neutra (Yupsanis *et al.* 1996). Mientras que, en plántulas de coliflor se han caracterizado 14 nucleasas con características enzimáticas diversas, con distinta especificidad de sustrato y con distinto requerimiento de cationes (Lesniewicz *et al.* 2010). Con respecto a esto último, 4 nucleasas son Zn^{2+} -dependientes, 5 Ca^{2+} -dependientes, 2 Mg^{2+} -dependientes, tres Ca^{2+}/Mg^{2+} -dependientes y una cuya actividad es independiente del ión (Lesniewicz *et al.* 2010). En coliflor se ha analizado de forma pormenorizada diferentes tejidos de la plántula y en diferentes estados del desarrollo, mientras que en judía se ha analizado los ejes completos. Por lo tanto, otras nucleasas con actividad específica en algunos tipos celulares

podrían estar presentes en judía y no detectarse al determinar la actividad en ejes completos.

El papel de las nucleasas durante la germinación se conoce en más profundidad en cereales, al ser el modelo elegido para el estudio de la muerte celular programada durante la germinación (Domínguez y Cejudo 2006). Se ha descrito la inducción de una nucleasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependiente en el núcleo de las células de la aleurona durante la germinación (Domínguez *et al.* 2004) y de una nucleasa Zn^{2+} -dependiente en el núcleo de las células del escutelo (Domínguez *et al.* 2012). La nucleasa Zn^{2+} -dependiente no se detectó cuando granos de trigo se imbibieron en presencia de ácido abscísico, el cual inhibió la germinación. Lo que sugiere que el principal papel de esta enzima sería el desmantelamiento del núcleo durante la MCP que acontece en estos tejidos durante la germinación (Domínguez *et al.* 2012). Otras dos endonucleasas se han descrito en coleoptilos de trigo, WEN1 (Fedoreyeva *et al.* 2007) y WEN2 (Fedoreyeva *et al.* 2008), las cuales tiene la particularidad de ser sensibles al estado de metilación del ADN y dependientes de S-Adenosinil-L-metionina y análogos. Se ha observado que la pérdida de viabilidad de las semillas por el envejecimiento del embrión se produce por diversos factores entre los que destacan la temperatura y la humedad de almacenaje de las semillas. Además, el envejecimiento del embrión implica la degradación de los ácidos nucleicos. El almacenamiento del grano de trigo provoca su envejecimiento, y se produce en el embrión un incremento en la actividad nucleasa y un descenso en la actividad ribonucleasa, mientras los valores de estas actividades en el endospermo no variaron (Spano *et al.* 2007). Por tanto, la inducción de las nucleasas en la semilla está compartimentarizada y sigue diferente cronología. En Spano y col, 2007, además, se propone a las actividades nucleasas como herramienta indicadores del efecto del almacenaje sobre la viabilidad de las semillas, o del grado de envejecimiento del embrión.

2. Identificación de la nucleasa purificada en ejes. Análisis de la familia S1/P1 en judía

El gen que codifica la nucleasa purificada a partir de ejes en desarrollo se ha identificado a partir de péptidos obtenidos mediante secuenciación *de novo* de dicha proteína. El gen se ha identificado como una nucleasa S1/P1 y se ha denominado *PVNI*. La identificación del gen a partir de las proteínas es una estrategia muy valiosa, especialmente cuando el número de secuencias candidatas es muy elevado. Además, la disponibilidad del genoma completo de *Phaseolus vulgaris*, aunque fue posterior al inicio del planteamiento de este trabajo, ha permitido identificar que junto con *PVNI* hay cuatro genes más que constituyen la familia de nucleasas tipo S1/P1 en judía, a los que se les ha denominado *PVN2*, *PVN3*, *PVN4* y *PVN5*. Los genes de las nucleasas suelen presentarse como familias multigénicas. En *Arabidopsis thaliana*, la familia S1/P1 de nucleasas, está constituida por cinco miembros al igual que en judía, denominadas nucleasas ENDO (Lesniewicz *et al.* 2013). Entre las nucleasas de esta familia se encuentra BFN1 o ENDO1 citada anteriormente (Pérez-Amador *et al.* 2000). No obstante, el número de genes que componen esta familia varía según la especie, así en *Oryza sativa* está compuesta por 4 genes y en *Medicago truncatula* por 6 miembros (www.Phytozome.org).

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas para los miembros de la familia S1/P1 en judía con otras nucleasas S1/P1 revela una alta identidad. Todas comparten los nueve aminoácidos que constituyen los sitios de unión de los tres iones Zinc caracterizados en P1 (Maekawa *et al.* 1991). Todos estos aminoácidos se encuentran en la misma posición y están altamente conservados en la nucleasa S1 (Iwamatsu *et al.* 1991), las nucleasas ENDO (Lesniewicz *et al.* 2013), BFN1 (Aoyagi *et al.* 1998), ZEN1 (Ito y Fukuda 2002) y CEL1 (Yang *et al.* 1999). También comparten los residuos de cisteína que participan en la formación de los puentes de disulfuro, los aminoácidos con

posibilidad de estar glicosilados y los que constituyen los sitios activos característicos en las nucleasas S1/P1. La arginina situada en el sitio activo en P1 (posición 48) se conserva en todas las nucleasas de judía, en ZEN1 y CEL1, mientras que en *Arabidopsis* sólo se encuentra en ENDO1 o BFN1 y en los demás miembros de la familia se sustituye por una lisina. Curiosamente, esta diferencia también se observa en la secuencia S1 de *Aspergillus* a pesar de ser homóloga a P1 (Lesniewicz *et al.* 2013). Por otro lado, la similitud de los genes de la familia S1/P1 con los dos sitios de reconocimiento y unión a los ácidos nucleicos descritos en P1 es mucho menor. El primer sitio de unión se localiza cerca del sitio activo y consiste en un bolsillo constituido por los aminoácidos fenilalanina y valina y en el centro se encuentra una asparragina. El segundo bolsillo de unión está constituido por dos tirosinas y en el centro un aspartato P1 (Lesniewicz *et al.* 2013). En judía, el primer sitio se encuentra parcialmente conservado en todas las secuencias a excepción de PVN4, mientras que no hay similitud con el segundo sitio de unión. Lo mismo ocurre en las nucleasas ENDO, ZEN1, CEL1 y S1 (Lesniewicz *et al.* 2013).

Respecto a la localización de las nucleasas en las plantas, se han identificado en vacuola, mitocondria, núcleo y espacio intermembrana (Mittler y Lam 1995; Sugiyama *et al.* 2000; Balk *et al.* 2003; Domínguez *et al.* 2004; Langston *et al.* 2005). Mediante técnicas de inmunolocalización se ha demostrado la presencia de una nucleasa en ER, Golgi, cuerpos proteicos y vacuolas en las células de la aleurona de cebada (Holstein *et al.* 1991). La localización de BFN1 a lo largo del desarrollo de la senescencia se ha determinado mediante la construcción de una proteína BFN1 recombinante uniéndole el gen reportador GFP a su carboxiterminal con la que se han transformado protoplastos de tabaco y hojas de *Arabidopsis* (Farage-Barhom *et al.* 2011). La nucleasa BFN1 recombinante se sitúa en el interior de unas estructuras filamentosas distribuidas por todo el citoplasma, las cuales se van agrupando en torno al núcleo con el desarrollo de

la senescencia. Por último, en la fase final de la muerte celular se observan vesículas formadas por restos de ácidos nucleicos y BFN1. El origen de estas estructuras podría ser el RE y se postula que podrían servir como un almacenamiento de la nucleasa para evitar que degraden los ácidos nucleicos presentes en el citoplasma. Una vez que se desencadena la muerte celular, las estructuras organizadas alrededor del núcleo darían lugar a las vesículas mediante la fusión con restos nucleares (Farage-Barhom *et al.* 2011). El análisis de la secuencia BFN1 mediante el programa Signal P 4.0 con los algoritmos de la herramienta TargetP 1.1 predice la presencia de un péptido señal de secreción a retículo endoplásmico, al igual que ocurre en todas las secuencias aminoacídicas deducidas para las nucleasas S1/P1 de judía. Este hecho unido a que PVN1 comparte las características catalíticas de BFN1, sugiere que la localización y el mecanismo de acción de esta nucleasa de judía podría ser similar, apoyando la hipótesis de que PVN1 actúa en la fase final de la MCP, como se mencionó anteriormente. La nucleasa tipo S1 de Zinia ZEN1, que comparte características enzimáticas con PVN1 y posee un péptido señal de secreción a RE, está implicada en la degradación de ADN nuclear apoyando el papel biológico que se ha sugerido (Ito y Fukuda 2002).

La construcción de árboles filogenéticos permite el estudio del origen y la evolución de la familia génica. Las nucleasas S1/P1 de plantas podrían proceder de un ancestro común a S1 y que sería diferente del gen que originó las nucleasas en musgos, como sugiere la posición externa en el árbol de los dos genes de *Physcomitrella* (Lesniewicz *et al.* 2013). A partir de un único gen se originaron nuevos genes probablemente por duplicación, y que mediante nuevas mutaciones y procesos de selección natural originarían los distintos miembros de las familias de nucleasas, los cuales poseerían características diferentes y por tanto funciones biológicas diferentes (Copley *et al.* 2002). En judía, el análisis del árbol filogenético sugiere que PVN1 y PVN2 proceden de

la duplicación de un ancestro común, del cual surgieron el resto de los miembros de la familia. Las familias de las nucleasas de *Arabidopsis* y *Medicago* habrían surgido del mismo modo que en judía. Todas las familias de genes nucleasas S1/P1 están organizadas en 3 clados distintos, con al menos un gen en cada uno de ellos (Lesniewicz *et al.* 2013). Se ha postulado la existencia de dos estrategias distintas en la evolución de la familia S1 de *Arabidopsis* y que sería válida para el resto de plantas. La primera tendencia sería para los genes situados en el cromosoma 4 (ENDO3, ENDO4 y ENDO5), los cuales tienen mayor especificidad catalítica y de expresión. La segunda tendencia evolutiva seguida por los otros genes (ENDO1 y ENDO2) implica propiedades catalíticas más amplias (Lesniewicz *et al.* 2013). Esta hipótesis sugiere que los miembros de la familia S1/P1 tendrían funciones diferenciadas en distintas condiciones fisiológicas e incluso podrían tener un papel secuencial en un mismo proceso o llevar a cabo una función específica en los distintos tejidos (Lesniewicz *et al.* 2013).

3. Nucleasas S1/P1 en ejes de judía

La expresión de *PVNI* en ejes completos de judía coincide con el patrón de la actividad nucleasa de 37 kDa, además es el único gen que se expresa. En radículas de plántulas se detectan otras nucleasas cuando la actividad se desarrolla a pH neutro, coincidiendo además con la expresión de los genes *PVN2* y *PVN5*, aunque en unos niveles mucho menores que *PVNI*. Las nucleasas codificadas por *PVN2* como *PVN5* podrían tener menos actividad y un tamaño similar al de *PVNI*, haciéndolas difícil de detectar o diferenciarlas de *PVN1*. La presencia de varias nucleasas en distintos tejidos se ha observado en plántulas de coliflor (Lesniewicz *et al.* 2010). En los ejes de plántulas expuestos a diversas condiciones durante su desarrollo no se observa expresión de los genes *PVN3*, *PVN4* o *PVN5*, ni tampoco actividad de otras nucleasas distintas a la de 37 kDa, aún realizando el ensayo en diversas condiciones.

La luz en las plantas es una de las principales señales que determinan el crecimiento y desarrollo. El desarrollo del eje embrionario en oscuridad promueve la escotomorfogénesis, que se caracteriza por el desarrollo de hipocotilos elongados y débiles en búsqueda de la luz, un menor desarrollo de la raíz y los cotiledones se mantienen sin desplegarse pegados al eje (Josse y Halliday 2008). Esta estrategia de crecimiento persigue que las reservas de la semilla se economícen, invirtiendo lo mínimo en la elongación del eje en búsqueda de luz para desarrollar metabolismo autótrofo (Josse y Halliday 2008). En judía, la cantidad y expresión de PVN1 disminuye en condiciones de etiolización, además se observa un descenso en la concentración de ureidos. Esto sugiere una relación entre la demanda de nutrientes por parte del embrión con la inducción de la actividad nucleasa. El descenso en la actividad y expresión de PVN1 en ejes de plántulas desarrolladas en medio suplementado con nitrato o fosfato apoya esta posible relación. La disponibilidad de estos nutrientes por parte de la plántula en desarrollo provocaría una ralentización en la movilización de las reservas. La actividad nucleasa *in vitro* en ejes de judía se regula por fosfato inorgánico y pirofosfato en ejes al igual que las nucleasas de hoja perejil (Canetti *et al.* 2002) y de hoja senescente de tomate (Lers *et al.* 2001). Esta inhibición implicaría una regulación feed-back de la enzima, ya que estos compuestos se originan durante la degradación de los ácidos nucleicos. Este comportamiento es similar al de otras enzimas descritas en procesos de senescencia por lo que la nucleasa de ejes también estaría implicada en la degradación de los ácidos nucleicos.

La salinidad es como uno de los principales factores que afectan a la productividad agrícola en el mundo, y concretamente *P. vulgaris* es una de las leguminosas más sensibles al estrés salino llegando a suponer pérdidas de más del 50% de la producción (Gama *et al.* 2007). El estrés salino causa un déficit de agua en la planta como consecuencia del desequilibrio del potencial hídrico

en la rizosfera, una toxicidad directa por los iones Na^+ y Cl^- y un déficit en la nutrición mineral causado por la reducción de su absorción y transporte (Grattan y Grieve 1999). Como consecuencia, se produce una seria disfunción en muchos de los procesos vitales y alteraciones en la morfología y metabolismo de la planta. La planta responde con un incremento en la concentración de compuestos antioxidantes, de enzimas con función antioxidante y de proteínas osmorreguladoras (Gorcek y Erdal 2015). Se ha sugerido que los ureidos además pueden actuar como compuestos antioxidantes protegiendo a los tejidos ante situaciones de estrés (Brychkova *et al.* 2008). La concentración de ureidos así como la actividad y expresión los genes de la familia S1/P1 de judía no se afecta por el desarrollo de plántulas en presencia de sal, a diferencia de los esperado. El tratamiento de plántulas de arroz con una alta concentración de sal a las pocas horas de la emergencia radicular produce la muerte celular en la punta de las raíces (Liu *et al.* 2007) así como la inducción de dos endonucleasas en las radículas relacionada directamente con la degradación de los ácidos nucleicos que se produce durante la muerte celular programada inducida por el estrés salino (Jiang *et al.* 2008). En hojas de plantas de cebada sometidas a estrés salino aumenta la expresión del gen Bnucl (Muramoto *et al.* 1999). Sin embargo, los valores de actividad nucleasa y ribonucleasa fueron inferiores en plántulas de dos leguminosas, alfalfa y lenteja, germinadas en presencia de sal, aunque la respuesta al estrés varía entre estas especies (Yupsanis *et al.* 2001).

Las actividades nucleasas de judía no se afectan en ejes por incluir en el medio de imbibición H_2O_2 . Este compuesto puede inducir la senescencia y MCP (Guo y Crawford 2005). En cotiledones de coliflor si se inducen dos nucleasas como consecuencia del tratamiento con H_2O_2 (Lesniewicz *et al.* 2010), aunque en coliflor el tratamiento fue más corto (1 día frente a 4). En cultivos celulares de soja bajas concentraciones de H_2O_2 (1-2 mM) activa las enzimas antioxidantes,

mientras que concentraciones superiores a 5 mM desencadenan la muerte celular programada (Levine *et al.* 1994). El ácido jasmónico y sus ésteres, como el metiljasmonato, son un grupo de fitohormonas que participan en la regulación del desarrollo de la planta y están involucradas en la señalización ante situaciones que provoquen estrés tanto abiótico como biótico (Wolf *et al.* 2012). A estos compuestos se les atribuye la capacidad de inducir las actividades antioxidantes para hacer frente a las especies reactivas que se liberan durante el estrés (Noriega *et al.* 2012). La actividad nucleasa y la expresión de PVN1 así como la concentración de ureidos es mayor en las plántulas de judía tratadas con metiljasmonato. El efecto del MeJA también se ha estudiado en otros casos y no causó variaciones en la actividad nucleasa que se induce durante la senescencia de las hojas de tomate (Lers *et al.* 2001) y perejil (Canetti *et al.* 2002).

Los resultados de los diferentes experimentos fisiológicos sugieren que PNV1 se regula por el estado de movilización de las reservas y además estaría implicada en procesos de degradación de los ácidos nucleicos de células en las que se ha iniciado la muerte celular programada en respuesta a estrés.

4. Nucleasas de la familia S1/P1 involucradas en procesos de muerte celular programada

La muerte celular programada (MCP), además de desencadenarse en respuesta a estrés de tipo abiótico o biótico, es un evento necesario y muy importante para el desarrollo de la planta desde la embriogénesis a la diferenciación de tejidos y formación de órganos como flores, frutos y semillas. Este proceso está sometido a una rigurosa programación genética y en él intervienen complejas rutas de señalización. La MCP en plantas ha sido menos estudiada que en animales, aunque los procesos que se desencadenan son similares, como la reducción del tamaño de la célula, la contracción del núcleo y la fragmentación

del ADN (Aleksandrushkina y Vanyushin 2009; Rantong *et al.* 2015). La fragmentación del ADN nucleosomal es un marcador de MCP, descrito en coleoptilos y primera hoja de trigo (Kirnos *et al.* 1997; Yupsanis *et al.* 2004) y en hojas de cebada y arroz (Liljeroth y Bryngelsson 2002). La principal función de la degradación del ADN durante la MCP sería la eliminación de todo el material genético de la célula y el reciclaje de los productos liberados para ser utilizados por la planta en el desarrollo de otros órganos (Thomas *et al.* 2003). A la mayoría de las nucleasas codificadas por genes de la familia S1/P1 se les atribuye además, la implicación en la degradación de los ácidos nucleicos que se produce durante procesos de muerte celular programada (Lesniewicz *et al.* 2013). Algunas de estas nucleasas serían: BFN1, que se induce en hojas y tallo de *Arabidopsis* durante la senescencia (Pérez-Amador *et al.* 2000), BEN1 una nucleasa involucrada en la degradación del endospermo en cebada (Aoyagi *et al.* 1998), ZEN1 de *Zinia* relacionada con la muerte celular programada que se produce durante la diferenciación de los elementos traqueales (Ito y Fukuda 2002) y DSA6 de lirio de día que se expresa en pétalos senescentes (Panavas *et al.* 2000). La construcción del promotor del gen BFN1 unido al gen reportero GUS con el que se transformó *Arabidopsis* y tomate ha demostrado expresión en diferentes procesos de MCP relacionados tanto con la senescencia como el desarrollo (Farage-Barhom *et al.* 2008). En *Arabidopsis* se expresa en tejidos vasculares de raíz, hojas de plántulas, durante la formación de las semillas, y durante el desarrollo del carpelo y los estambres. En tomate se expresa en tallo durante la formación de vasos y en pétalos de flores senescentes. En ambas plantas se detectó expresión en zonas de abscisión de hojas y frutos.

4.1. Nucleasas involucradas en MCP durante el desarrollo de órganos

En flores de judía analizadas en conjunto sólo hay una actividad nucleasa mayoritaria y solo se expresa el gen *PVNI*, a pesar de ser órganos muy complejos y analizar tres estadios de desarrollo diferentes. Posiblemente, en los

diferentes tejidos que componen la flor de judía participen más nucleasas que no se detectan al analizarse la flor en conjunto. La mayoría de los estudios realizados sobre nucleasas en flor se han llevado a cabo sobre senescencia. Se ha descrito la implicación de nucleasas durante la degradación del *tapetum*, la capa de células que rodea a la antera y cuyos productos se destinarán a la formación del grano de polen (Aleksandrushkina y Vanyushin 2009). En lirios de día, *Hemerocallis hybrid*, se inducen nucleasas capaces de hidrolizar ADNmc y ADNbc a pH neutro, conforme se desarrolla la senescencia en pétalos (Panavas *et al.* 2000). En esta misma flor se ha identificado otro gen que codifica una nucleasa S1 (DAS6) cuya expresión se detecta únicamente durante la senescencia de la corola (Panavas *et al.* 1999). En pétalos senescentes de clavel también se ha identificado expresión de la nucleasa DCNUC1 (Narumi *et al.* 2006). En las anteras de cebada se expresan los genes *Bnucl* y *BENI* que codifican dos nucleasas de la familia S1 relacionados con la formación del polen (Zaina *et al.* 2003). Aunque estos genes también se expresan en procesos de muerte celular durante la germinación de la semilla y la senescencia de la hoja (Zaina *et al.* 2003). En tépalos senescentes de narciso se ha identificado un incremento de la expresión de una nucleasa tipo S1 (Hunter y Reid 2001). El clonaje del ADNc de la nucleasa DCNUC1 de clavel, ha permitido conocer que se expresa en pétalos senescentes (Narumi *et al.* 2006). La nucleasa de *Petunia hybrida* incrementa en flores fecundadas y con el desarrollo de la senescencia de la corola. Esta nucleasa muestra un comportamiento atípico ya que el Co^{2+} fue el único catión que recuperó la enzima inhibida por EDTA (Langston *et al.* 2005). En pétalos senescentes de otra especie de petunia, *P. inflata*, se han determinado hasta cinco nucleasas (D1, D2, D3, D4 y D5) que, a excepción de D1, digieren ADNbc a pH neutro además de ADNmc (Xu y Hanson 2000). La nucleasa asociada a senescencia de hoja también se determinó en flor de *Arabidopsis* (Pérez-Amador *et al.*

2000). Una exonucleasa DPD1 se ha identificado en polen de *Arabidopsis* que se localiza únicamente en cloroplastos y mitocondria (Matsushima *et al.* 2011).

Los estudios realizados sobre las nucleasas en frutos son muy escasos. En frutos de judía se observa expresión de los genes *PVN1* y *PVN5*, de forma diferencial a lo largo del desarrollo del fruto y semilla. En frutos A y B se detecta una nucleasa ácida de 37 kDa y una neutra de 34 kDa. Esta última nucleasa que podría corresponder esta última a *PVN5*. En semilla en desarrollo se observa una alta actividad de otra nucleasa neutra de 32 kDa y un valor alto de expresión del gen *PVN5*. Las nucleasas de 32 y 34 kDa podrían ser proteínas distintas, aunque también cabría pensar que, en base a su pH óptimo y a la expresión del gen *PVN5* en estos tejidos, estas nucleasas de podrían ser la misma y que la pequeña variación en el tamaño se deba a una diferencia en la modificación postraduccional. Estas nucleasas son glicoproteínas y, como se ha demostrado la diferente adición de monosacáridos afecta su movilidad electroforética (Ko *et al.* 2012). Así, nucleasas de *Arabidopsis* sobreexpresadas de forma individual en protoplastos de hoja originan proteínas de distintos tamaños en el caso de *ENDO1*, *ENDO2* y *ENDO4* (Lesniewicz *et al.* 2013). Las nucleasas en frutos podrían estar implicadas en la MCP que acontece en dichos tejidos durante su organogénesis. Un estudio reciente muestra la inducción de dos nucleasas en pepinos inmaduros en los que se produce muerte celular programada como consecuencia del tratamiento continuado con etileno (Lee *et al.* 2015). Respecto a la semilla en desarrollo, se ha descrito que el suspensor, que está compuesto por miles de células en dicotiledóneas, se degrada mediante MPC cuando ya no es necesario se degrada lo que implica la participación de de nucleasas (Lombardi *et al.* 2007). Lo mismo que ocurriría durante la formación de la testa o capas celulares que envuelven la semilla (Lombardi *et al.* 2007).

4.2. Nucleasas involucradas en MCP durante la senescencia

La senescencia en hojas es un proceso complejo y de vital importancia para el ciclo de vida de la planta, donde se produce una masiva desintegración a nivel estructural y funcional de sus células. Este proceso está altamente controlado, aunque aún se desconoce mucho sobre los mecanismos de regulación, de señalización, así como genes implicados. Distintas enzimas hidrolíticas degradan los compuestos orgánicos de las hojas que serán reciclados y movilizados a tejidos en desarrollo (Sakamoto y Takami 2014). Sin embargo, por el momento la degradación de los ácidos nucleicos que acontece en este proceso aún no se conoce por completo (Sakamoto y Takami 2014). El conocimiento de la senescencia foliar resultará crucial en aplicaciones prácticas con gran impacto sobre rendimiento de los cultivos, mejoras en cosechas y mejoras en la maduración del fruto (López-Fernández *et al.* 2015).

Durante la senescencia natural e inducida por oscuridad prolongada en hojas de judía se inducen dos nucleasas de 34 y 39 kDa a pH neutro, coincidiendo con el descenso más acusado en los niveles de clorofila y de proteína soluble. La inducción de estas dos nucleasas en los dos tipos de senescencia sugiere que participan en el catabolismo de los ácidos nucleicos mediante un proceso similar en ambos casos. Estas dos nucleasas no requieren de la inclusión de cationes en el ensayo pero se inhiben por EDTA y su actividad se recupera con Zinc. Esto indica que son Zn^{2+} -dependientes, aunque a diferencia de lo descrito no son ácidas. Por otro lado, la mayoría de las nucleasas que participan en la MCP de hojas senescentes, se ha descrito que son del tipo Ca^{2+}/Mg^{2+} -dependientes dependientes (Mittler y Lam 1995; Xu y Hanson 2000; He y Kermode 2003).

Los genes *PVN2* y *PVN5* incrementan de su expresión durante la senescencia tanto natural como inducida por oscuridad, lo que sugiere que están implicados

en dicho proceso. Estos dos genes podrían codificar las dos nucleasas inducidas durante la senescencia y en base a los resultados de fruto se podría sugerir que *PVN5* codifica a la nucleasa neutra de 34 kDa y que *PVN2* codifica a la nucleasa de 39 kDa. No obstante, estas nucleasas son glicoproteínas y por tanto no se puede descartar que las dos nucleasas sean realmente una única proteína con diferencias en las modificaciones postraduccionales. En tomate también se han identificado dos nucleasas inducidas en senescencia, LeNUC1 y LeNUC2 (Lers *et al.* 2001). LeNUC1 es una glicoproteína que hidroliza ARN y ADNmc con pH óptimo comprendido entre 7,5-8. La nucleasa LeNUC2 tiene las mismas características bioquímicas, pero esta proteína no presenta glicosilaciones y por tanto, su tamaño es menor (Lers *et al.* 2001). Lo mismo se ha sugerido en perejil, donde se inducen las nucleasas PcNUC1 y PcNUC2 durante la senescencia en hojas (Canetti *et al.* 2002). Estas nucleasas pueden hidrolizar ARN y ADNmc a pH básico (8,5-9). PcNUC1 y PcNUC2 son glicoproteínas. Se han descrito otras nucleasas denominadas PcNUC3 y PcNUC4, de menor masa molecular y corresponden a nucleasas no glicosiladas (Canetti *et al.* 2002). Tanto las dos nucleasas de tomate como las de perejil se inhiben por EDTA y se recuperan mediante la inclusión de Co^{2+} o Mn^{2+} .

Las nucleasas inducidas en hojas senescentes de judía pueden digerir ADNmc y ARN. También se detecta la inducción durante la senescencia de dos ribonucleasas de 14 y 28 kDa. Varias ribonucleasas se han identificado en hojas senescentes de plantas como RNS2 y RNS3 de *Arabidopsis* (Yen y Green 1991); tres ribonucleasas en trigo (Blank y McKeon 1991), la ribonucleasa Lx en tomate (Lers *et al.* 2001) y varias ribonucleasas en perejil (Canetti *et al.* 2002). Recientemente se ha descrito la existencia 4 nucleasas de masas moleculares 18, 26, 33 y 38 kDa en hojas senescentes de quinoa con actividad a pH 8 en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} y con capacidad de digerir ADNmc y ADNbc, encontrándose diferencias en la afinidad por estos sustratos bajo las

mismas condiciones de ensayo y además presentan capacidad para realizar cortes o muescas en el ADNbc (López-Fernández *et al.* 2015). En hojas de trigo (Granot *et al.* 2015) y quinoa (Lopez-Fernández *et al.* 2015) se ha identificado nucleasas con capacidad de hidrolizar ADNbc y cuya función parece estar relacionada con la MCP.

En estudios con microarrays en *Arabidopsis* se ha descrito incremento en expresión de las nucleasas AtCAN1 y AtCAN2 que pertenecen a otro gran grupo, las SNasas. Estas nucleasas comparten las características similares a las descritas en estafilococo, poseen un pH óptimo neutro, son Ca²⁺ dependientes y muestran capacidad de utilizar como sustrato ADNmc, ADNbc y ARN aunque con distinta especificidad (Lesniewicz *et al.* 2012). En hojas senescentes de *Arabidopsis* también se ha observado el incremento en el nivel de transcritos de la exonucleasa DPD1 (Tang y Sakamoto 2011). También se han identificado varias nucleasas en hojas senescentes de coliflor cuyas características catalíticas son muy diversas (Lesniewicz *et al.* 2010). Aunque es muy amplio el número de nucleasas caracterizadas y con implicación en la degradación de ácidos nucleicos, no está totalmente definida cuales lo hacen durante la senescencia y cómo (Sakamoto y Takami 2014). Tampoco son muchos los genes identificados que codifican estas nucleasas. Como se ha comentado anteriormente la nucleasa BFN1, del tipo S1, incrementa mucho su expresión en hoja senescentes de *Arabidopsis* (Pérez-Amador *et al.* 2000).

Los experimentos de senescencia foliar en judía sugieren la utilización de los ureidos como moléculas de transporte en otros procesos a parte del transporte del nitrógeno fijado. En la senescencia natural los compuestos procedentes de la degradación se exportarían hacia otras partes de la planta impidiendo su acumulación. Sin embargo, los ureidos si se acumulan en aquellas hojas en las que se indujo la senescencia por oscuridad, siendo mayor cuando las hojas se

aíslan de la planta. Se han utilizado hojas de plantas que no estaban en condiciones de fijación de nitrógeno para independizar la acumulación de ureidos del transporte de nitrógeno fijado en forma de estos compuestos. Por lo tanto, es muy probable que los ureidos acumulados procedan de la oxidación de las purinas liberadas tras la degradación de los ácidos nucleicos. A los ureidos se les han asignado también un papel protector durante la senescencia (Brychkova *et al.* 2008). Se ha descrito una acumulación de ureidos en hojas de *Arabidopsis* sometidas a senescencia inducida por oscuridad y se les ha adjudicado un papel como moléculas antioxidantes (Brychkova *et al.* 2008). En hojas y tallo de diferentes variedades de judía también se ha descrito una acumulación de ureidos en respuesta al estrés hídrico (Coletto *et al.* 2014).

Los cotiledones son otros órganos donde el proceso movilización de nutrientes tiene una gran importancia fisiológica. En cotiledones de judía hay gran cantidad de proteínas de reserva, la 7-S globulina denominada faseolina que representa un 50% del contenido total en proteína (Harada *et al.* 2010). Aunque el mecanismo que regula el metabolismo de la faseolina aún no está ampliamente descrito (López-Pedrouso *et al.* 2014), la degradación de las proteínas de reserva proporciona una gran cantidad de nitrógeno para la plántula. Los ácidos nucleicos también podría ser una fuente de nutrientes como fósforo, nitrógeno y nucleótidos que son altamente demandados por la plántula, especialmente si los ácidos nucleicos son almacenados como consecuencia de los procesos de endorreduplicación (Rewers y Sliwiska 2012). En plantas los nucleótidos, nucleósidos y nucleobases son transportados gracias a la existencia de transportadores de membrana (Mohlmann *et al.* 2010). El conocimiento sobre la movilización de los productos liberados de la hidrólisis del ADN durante la senescencia de cotiledones es muy limitado. Se ha descrito una fuerte inducción de nucleasas en cotiledones senescentes de coliflor, con gran diversidad en masa molecular, pH óptimo y sustratos

requeridos, lo que sugiere la participación en la redistribución de los nutrientes (Lesniewicz *et al.* 2010).

En cotiledones de judía se ha observado el incremento de varias actividades nucleasas de masas moleculares 32, 35 y 42 kDa durante la senescencia. Estas proteínas tienen un pH óptimo neutro y son $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependientes. Todas estas nucleasas degradan ADNmc, y sólo la nucleasa de 41 kDa digiere el ARN y ADNbc. También se ha observado la inducción de dos ribonucleasas durante la senescencia de cotiledones de tamaños 15 y 17 kDa. Con respecto a la expresión, sólo lo hacen los genes *PVN4* y *PVN5* de la familia S1/P1. Por lo tanto difiere del número de nucleasas inducidas. Como se ha discutido anteriormente en frutos en desarrollo, el gen *PVN5* podría codificar proteínas de diferente masa molecular 32 y 35 kDa con distinto estado de maduración postraducciona. Por otro lado, también podrían tratarse de nucleasas pertenecientes a otra familia. En cotiledones senescentes es el único tejido donde se ha observado expresión de *PVN4* se detecta actividad de la nucleasa de 41 KDa. Además sus características catalíticas son diferentes a las del resto, por lo que este gen podría ser el que codifica dicha proteína.

La inducción de las actividades nucleasas y la expresión de los miembros S1/P1 en cotiledones senescentes muestran una posible relación con los procesos de movilización y reciclaje de los nutrientes de estos órganos. Esta hipótesis se ha corroborado con los resultados en experimentos de rejuvenecimiento de cotiledones mediante la decapitación del epicotilo. Este sistema ha retrasado distintos parámetros relacionados con la senescencia de cotiledones en soja (Ananieva *et al.* 2008) y calabacín (Jasid *et al.* 2009). En cotiledones rejuvenecidos de judía también se observa una ralentización de la movilización de las reservas. Paralelamente, se observó una menor inducción de las actividades nucleasas acompañado de un descenso del nivel de expresión

de *PVN4* y *PVN5*. El efecto opuesto se obtiene cuando se analizan plántulas cultivadas con déficit de nitrato y fosfato. En este caso, las reservas se movilizaron más rápidamente y la inducción de la actividad, así como la de la expresión de las nucleasas fue mayor.

La implicación de las nucleasas en MCP está bien establecida aunque aún son pocos los casos donde se correlaciona actividad con el gen que la codifica. Tampoco se conoce si las mismas enzimas participan en todos los procesos en los que se requiere degradación del ADN o son enzimas distintas (Lesniewicz *et al.* 2013). Algunos autores sugieren que la existencia de las diferentes nucleasas está relacionada con la acción en los diferentes estados de la MCP (Sugiyama *et al.* 2000). La existencia de las diferentes nucleasas refleja la complejidad del mecanismo que regula la degradación el ADN durante la muerte celular. Además la diversidad en las características catalíticas de las diferentes nucleasas de judía también se ha discutido en otros organismos (Lesniewicz *et al.* 2013). Tradicionalmente a las nucleasas de la familia S1/P1 se les ha atribuido características enzimáticas similares a las nucleasas tipo I como ocurre en *PVN1* o *ZEN1*. Sin embargo, se ha demostrado que la actividad de otros miembros de esta familia depende de la presencia de diversos iones, requieren sustratos de diferente naturaleza y sus valores de pH óptimo muestran un rango más amplio (Lesniewicz *et al.* 2010; Lesniewicz *et al.* 2013). La sobreexpresión de los genes *ENDO* ha aportado una información importante (Lesniewicz *et al.* 2013). De los cinco genes de la familia únicamente *ENDO3* tenía las características enzimáticas típicas del grupo nucleasas I, digiriendo preferentemente ADN_{mc} a pH ácido y en presencia de Zn^{2+} . Este es el gen que presenta mayor similitud con *PVN1*. Las nucleasas *ENDO1* y *ENDO4* tienen un pH óptimo neutro y su actividad enzimática requiere de Mn^{2+} y Ca^{2+} . Además *ENDO1* puede digerir ADN_{bc} en presencia de Mn^{2+} . La proteína *ENDO 2* muestra unas características enzimáticas muy

peculiares. A pH neutro se activa fuertemente en presencia de Mn^{2+} y Ca^{2+} , mientras que a pH ácido se activa en presencia simultánea de Zn^{2+} y Ca^{2+} y puede digerir ADNbc (Lesniewicz *et al.* 2013). La nucleasa OmBBD, otra enzima de la familia S1/P1, también requiere del ion Mn^{2+} (You *et al.* 2010). Haya que tener presente que la mayoría de las nucleasas identificadas muestran una gran afinidad por ácidos nucleicos de cadena simple, mientras que gran parte del ADN es de doble cadena. Por tanto muy probablemente junto con estas nucleasas participen otras nucleasas como las helicasas (Lesniewicz *et al.* 2013).

De los cinco genes que constituyen la familia S1/P1 en judía, cuatro de ellos (*PVNI*, *PVN2* y *PVN4* y *PVN5*) se han relacionado con diferentes procesos de muerte celular, aunque sólo se conoce la proteína que codifica *PVNI*. Futuros estudios basados en la sobreexpresión de estos genes permitirán conocer las características bioquímicas de las nucleasas que originan, donde actúan y por tanto conocer más acerca de su función. El gen *PVN2* se ha sobreexpresado como proteína heteróloga en *E.coli*. La proteína recombinante purificada no presentó actividad aunque podría permitir el desarrollo de anticuerpos. Entre las perspectivas futuras de este trabajo se encontrarían la puesta a punto de otros sistemas de sobreexpresión que permitan ampliar el conocimiento de los miembros de la familia de nucleasas S1/P1 en judía. El silenciamiento de estos genes podría aportar mucha información acerca de su papel biológico. La supresión del gen que codifica la ribonucleasa LX en tomate, provoca el retraso en la senescencia y la abscisión de la hoja, lo que implica que debe estar altamente involucrada en este proceso (Lers *et al.* 2006).

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. En ejes en desarrollo de judía se induce una proteína con actividad nucleasa tras la emergencia radicular. Esta actividad es mayoritaria y cataliza la degradación de ADNmc y ARN. Esta proteína tiene una masa molecular de 37 kDa y es una endonucleasa Zn^{2+} -dependiente.
2. La nucleasa mayoritaria de ejes está codificada por el gen *PVN1* que pertenece a la familia de las nucleasas S1/P1. Esta familia en judía está formada por cinco genes.
3. El incremento en la concentración de ureidos en plántulas de judía podría ser consecuencia de la actividad de *PVN1*.
4. La expresión y actividad de *PVN1* se regula por el estado nutricional de las plántulas de judía durante la germinación y el desarrollo postgerminativo, mientras que no se afecta por otras condiciones ambientales.
5. La expresión y actividad de *PVN1* se relaciona con tejidos con alta tasa de crecimiento como ejes, flores, flores pequeños y semillas.
6. Los genes *PVN2* y *PVN5* están implicados en la degradación de ácidos nucleicos durante la senescencia de hojas. Los ureidos participan en la movilización de nutrientes desde las hojas.
7. Los genes *PVN4* y *PVN5* están implicados en la degradación de ácidos nucleicos durante la senescencia de cotiledones y su expresión está regulada por la de movilización de nutrientes de los cotiledones.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aleksandrushkina NI y Vanyushin BF (2009). Endonucleases and their involvement in plant apoptosis. *Russ. J. Plant Physiol.* 56: 291-305.
- Ananieva K, Ananiev ED, Doncheva S, Georgieva K, Tzvetkova N, Kaminek M, Motyka V, Dobrev P, Gajdosova S y Malbeck J (2008). Senescence progression in a single darkened cotyledon depends on the light status of the other cotyledon in *Cucurbita pepo* (zucchini) seedlings: potential involvement of cytokinins and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity. *Physiol. Plant.* 134: 609-623.
- Aoyagi S, Sugiyama M y Fukuda H (1998). BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett* 429: 134-138.
- Araki T (1903). Enzymatic decomposition of nucleic acid. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 38: 84-97.
- Atkins CA (1991). Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In Dilworth M. ang Glenn A. (eds.). *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*: 293-319. Elsevier, Amsterdam.
- Atkins CA y Smith PM (2000) *Ureide synthesis in legume nodules*. Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, UK
- Balk J, Chew SK, Leaver CJ y McCabe PF (2003). The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J.* 34: 573-583.
- Bewley JD (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Blank A y McKeon TA (1991). Expression of 3 RNase activities during natural and dark-induced senescence of wheat leaves. *Plant Physiol.* 97: 1409-1413.
- Borek S y Ratajczak W (2002). Sugars as a metabolic regulator of storage protein mobilization in germinating seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.). *Acta Physiol. Plant.* 24: 425-434.

- Bradford MM (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P y Vanderleyden J (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128.
- Brücher H (1988) The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- 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 J.* 54: 496-509.
- Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K y Leaver CJ (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 567-585.
- Buckeridge MS, Rayon C, Urbanowicz B, Tine MAS y Carpita NC (2004). Mixed linkage (1 → 3),(1 → 4)-beta-D-glucans of grasses. *Cereal Chem.* 81: 115-127.
- 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 Physiol Biochem* 53: 54-60.
- Canetti L, Lomaniec E, Elkind Y y Lers A (2002). Nuclease activities associated with dark-induced and natural leaf senescence in parsley. *Plant Science* 163: 873-880.
- Carbonaro M (2006). 7S globulins from *Phaseolus vulgaris* L.: Impact of structural aspects on the nutritional quality. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2620-2626.

- Carbonell-Bejerano P, Urbez C, Carbonell J, Granell A y Perez-Amador MA (2010). A Fertilization-Independent Developmental Program Triggers Partial Fruit Development and Senescence Processes in Pistils of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154: 163-172.
- Chen HM, Pang Y, Zeng J, Ding Q, Yin SY, Liu C, Lu MZ, Cui KM y He XQ (2012). The Ca²⁺-dependent DNases are Involved in Secondary Xylem Development in *Eucommia ulmoides*. *J. Integr. Plant Biol.* 54: 456-470.
- Choi DS y Hwang BK (2011). Proteomics and Functional Analyses of Pepper Abscisic Acid-Responsive 1 (ABR1), Which Is Involved in Cell Death and Defense Signaling. *Plant Cell* 23: 823-842.
- Cholewa E y Griffith M (2004). The unusual vascular structure of the corm of *Eriophorum vaginatum*: implications for efficient retranslocation of nutrients. *J Exp Bot* 55: 731-741.
- Christ B, Schelbert S, Aubry S, Sussenbacher I, Muller T, Krautler B y Hortensteiner S (2012). MES16, a member of the methylesterase protein family, specifically demethylates fluorescent chlorophyll catabolites during chlorophyll breakdown in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 158: 628-641.
- Coletto I, Pineda M, Rodino AP, De Ron AM y Alamillo JM (2014). Comparison of inhibition of N₂ fixation and ureide accumulation under water deficit in four common bean genotypes of contrasting drought tolerance. *Ann Bot* 113: 1071-1082.
- Copley RR, Letunic I y Bork P (2002). Genome and protein evolution in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol* 6: 39-45.
- Crowe JH, Crowe LM y Hoekstra FA (1989). Phase-transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 77-91.
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A y Granot D (1999). Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato

- plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11: 1253-1266.
- Desai NA y Shankar V (2003). Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiol Rev* 26: 457-491.
- Díaz-Leal JL, Torralbo F, Quiles FA, Pineda M y Alamillo JM (2014). Molecular and functional characterization of allantoate amidohydrolase from *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 152: 43-58.
- Distelfeld A, Avni R y Fischer AM (2014). Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *J. Exp. Bot.* 65: 3783-3798.
- Domínguez F y Cejudo FJ (2006). Identification of a nuclear-localized nuclease from wheat cells undergoing programmed cell death that is able to trigger DNA fragmentation and apoptotic morphology on nuclei from human cells. *Biochem J* 397: 529-536.
- Domínguez F y Cejudo FJ (2012). A comparison between nuclear dismantling during plant and animal programmed cell death. *Plant Science* 197: 114-121.
- Domínguez F, Moreno J y Cejudo FJ (2004). A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death. *J Biol Chem* 279: 11530-11536.
- Domínguez F, Moreno J y Cejudo FJ (2012). The scutellum of germinated wheat grains undergoes programmed cell death: identification of an acidic nuclease involved in nucleus dismantling. *J Exp Bot* 63: 5475-5485.
- Dorcey E, Urbez C, Blazquez MA, Carbonell J y Perez-Amador MA (2009). Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J.* 58: 318-332.

- Esmailzadeh S y Aminpanah H (2015). Effects of planting date and spatial arrangement on common bean (*Phaseolus vulgaris*) yield under weed-free and weedy conditions. *Planta Daninha* 33: 425-432.
- Farage-Barhom S, Burd S, Sonogo L, Mett A, Belausov E, Gidoni D y Lers A (2011). Localization of the *Arabidopsis* senescence- and cell death-associated BFN1 nuclease: from the ER to fragmented nuclei. *Mol Plant* 4: 1062-1073.
- Farage-Barhom S, Burd S, Sonogo L, Perl-Treves R y Lers A (2008). Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes. *J. Exp. Bot.* 59: 3247-3258.
- Fedoreyeva LI, Sobolev DE y Vanyushin BF (2007). Wheat endonuclease WEN1 dependent on S-adenosyl-L-methionine and sensitive to DNA methylation status. *Epigenetics* 2: 50-53.
- Fedoreyeva LI, Sobolev DE y Vanyushin BF (2008). Wheat coleoptile endonuclease Wen2 is dependent on S-adenosyl-L-methionine and sensitive to DNA methylation status. *Biochemistry (Mosc)* 73: 1000-1006.
- Fukuda H (1996). Xylogenesis: Initiation, Progression, and Cell Death. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 299-325.
- Galloway JN, Townsend AR, Erismann JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP y Sutton MA (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320: 889-892.
- Gama PBS, Inanaga S, Tanaka K y Nakazawa R (2007). Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 79-88.

- Gepstein S, Sabehi G, Carp MJ, Hajouj T, Neshar MFO, Yariv I, Dor C y Bassani M (2003). Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J.* 36: 629-642.
- Gepts P, Aragao FJL, Barros Ed, Blair MW, Brondani R, Broughton W, Galasso I, Hernández G, Kami J, Lariguet P, McClean P, Melotto M, Miklas P, Pauls P, Pedrosa-Harand A, Porch T, Sánchez F, Sparvoli F, Yu K, Moore PH y Ming R (2008). Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the Tropics. *Genomics of Tropical Crop Plants*: 113-143. Springer, New York.
- 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. *Mol. Plant.* 2: 108-119.
- Gómez MD, Vera-Sirera F y Pérez-Amador MA (2014). Molecular programme of senescence in dry and fleshy fruits. *J. Exp. Bot.* 65: 4515-4526.
- Gorcek Z y Erdal S (2015). Lipoic acid mitigates oxidative stress and recovers metabolic distortions in salt-stressed wheat seedlings by modulating ion homeostasis, the osmo-regulator level and antioxidant system. *J. Sci. Food Agric.* 95: 2811-2817.
- Granot G, Morgenstern Y, Khan A, Rapp YG, Pesok A, Nevo E y Grafi G (2015). Internucleosomal DNA fragmentation in wild emmer wheat is catalyzed by S1-type endonucleases translocated to the nucleus upon induction of cell death. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.* 1849: 239-246.
- Grattan SR y Grieve CM (1999). Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci. Hortic.* 78: 127-157.

- Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel MH, Grunwald D y Macherel D (2005). Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol.* 137: 157-167.
- Grenthy H (1969). Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Economic Botany* 23: 55-69.
- Gu HT, Wang DH, Li X, He CX, Xu ZH y Bai SN (2011). Characterization of an ethylene-inducible, calcium-dependent nuclease that is differentially expressed in cucumber flower development. *New Phytol.* 192: 590-600.
- Guo FQ y Crawford NM (2005). *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* 17: 3436-3450.
- Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, Shen JL, Han WX, Zhang WF, Christie P, Goulding KW, Vitousek PM y Zhang FS (2010). Significant acidification in major Chinese croplands. *Science* 327: 1008-1010.
- Guo KY, Liu SK, Takano T y Zhang XX (2012). Molecular cloning, expression, and characterization of a Ca^{2+} -dependent nuclease of *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expr. Purif.* 83: 70-74.
- Guo YF y Gan SS (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J.* 46: 601-612.
- Hara-Nishimura I y Hatsugai N (2011). The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death Differ* 18: 1298-1304.
- 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.
- He X y Kermode AR (2003). Nuclease activities and DNA fragmentation during programmed cell death of megagametophyte cells of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Mol Biol* 51: 509-521.

- Herrera-Rodríguez SE, Baylon-Pacheco L, Talamas-Rohana P y Rosales-Encina JL (2006). Cloning and partial characterization of *Entamoeba histolytica* PTPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342: 1014-1021.
- Heukeshoven J y Dernick R (1985). Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography* 326: 91-101.
- Holstein SEH, Kobert B, Hillmer S, Brown PH, Ho THD y Robinson DG (1991). Subcellular-localization of nuclease in barley aleurone. *Physiol. Plant.* 83: 255-265.
- Hörtensteiner S y Feller U (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* 53: 927-937.
- 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 Physiol.* 149: 961-980.
- Hunter DA y Reid MS (2001) Senescence-associated gene expression in Narcissus 'Dutch master'. In: BenArie R, PhilosophHadas S (eds) Proceedings of the 4th International Conference on Postharvest Science, Vols 1 and 2. International Society Horticultural Science, Leuven 1, pp 341-343.
- Isono K, Satoh K y Kobayashi H (2000). Molecular cloning of a cDNA encoding a novel Ca²⁺-dependent nuclease of *Arabidopsis* that is similar to staphylococcal nuclease. *Biochim. Biophys. Acta-Genet. Expression* 1491: 267-272.

- Ito J y Fukuda H (2002). ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. *Plant Cell* 14: 3201-3211.
- Iwamatsu A, Aoyama H, Dibo G, Tsunasawa S y Sakiyama F (1991). Amino-acid-sequence of nuclease S1 from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.* 110: 151-158.
- Jasid S, Galatro A, Villordo JJ, Puntarulo S y Simontacchi M (2009). Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. *Plant Science* 176: 662-668.
- Jasmin, Jelicks LA, Koba W, Tanowitz HB, Mendez-Otero R, Campos de Carvalho AC y Spray DC (2012). Mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of chagas disease. Where do the cells go? *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1971.
- Jiang AL, Cheng YW, Li JY y Zhang W (2008). A zinc-dependent nuclear endonuclease is responsible for DNA laddering during salt-induced programmed cell death in root tip cells of rice. *J. Plant Physiol.* 165: 1134-1141.
- Jiang L y Kermode AR (1994). Role of desiccation in the termination of expression of genes for storage proteins. *Seeds Science Research* 4: 149-173.
- Johnson P y Laskowski M (1968). Sugar unspecific Mung Bean Nuclease I. *The Journal of Biological Chemistry* 243: 3421-3424.
- Josse EM y Halliday KJ (2008). Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling. *Curr. Biol.* 18: R1144-R1146.
- Kaplan L (1981). What is the origin of the common bean? *Economic Botany* 35: 240-254.
- Karmous I, El Ferjani E y Chaoui A (2011). Copper Excess Impairs Mobilization of Storage Proteins in Bean Cotyledons. *Biol. Trace Elem. Res.* 144: 1251-1259.

- Khan MSA, Hamid A y Karim MA (1997). Effect of sodium chloride on germination and seedling characters of different types of rice (*Oryza sativa* L.). J. Agron. Crop Sci.-Z. Acker Pflanzenbau 179: 163-169.
- Kirnos MD, Alexandrushkina NI y Vanyushin BF (1997). Apoptosis in cells of the initial leaf and coleoptile of wheat seedlings: Internucleosomal fragmentation of genome and synthesis of "heavy" oligonucleosome-size DNA fragments. Biochem.-Moscow 62: 864-869.
- Ko CY, Lai YL, Liu WY, Lin CH, Chen YT, Chen LF, Lin TY y Shaw JF (2012). *Arabidopsis* ENDO2: its catalytic role and requirement of N-glycosylation for function. J Agric Food Chem 60: 5169-5179.
- Kollmer I, Werner T y Schmulling T (2011). Ectopic expression of different cytokinin-regulated transcription factor genes of *Arabidopsis thaliana* alters plant growth and development. J. Plant Physiol. 168: 1320-1327.
- Kou XH, Watkins CB y Gan SS (2012). *Arabidopsis* AtNAP regulates fruit senescence. J. Exp. Bot. 63: 6139-6147.
- Kuninaka A, Yoshino H, Sakaguchi K y Kibi M (1961). Studies on 5'-phosphodiesterases in microorganisms .2. properties and application of *Penicillium citrinum* 5'-phosphodiesterase. Agricultural and Biological Chemistry 25: 693-&.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. Nature 227: 680-&.
- Langston BJ, Bai S y Jones ML (2005). Increases in DNA fragmentation and induction of a senescence-specific nuclease are delayed during corolla senescence in ethylene-insensitive (*etr1-1*) transgenic petunias. J Exp Bot 56: 15-23.
- Lara MEB, García MCG, Fátima T, Ehness R, Lee TK, Proels R, Tanner W y Roitsch T (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. Plant Cell 16: 1276-1287.

- Laskowski M, Sr. (1980). Purification and properties of the mung bean nuclease. *Method Enzymol.* 65: 263-276.
- Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry R y Halford NG (2007). Asparagine in plants. *Ann. Appl. Biol.* 150: 1-26.
- Lee HO, Davidson JM y Duronio RJ (2009). Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev* 23: 2461-2477.
- Lee IC, Hong SW, Whang SS, Lim PO, Nam HG y Koo JC (2011). Age-Dependent Action of an ABA-Inducible Receptor Kinase, RPK1, as a Positive Regulator of Senescence in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Cell Physiol.* 52: 651-662.
- Lee JS, Hurr BM, Huber DJ, Vallejos CE y Sargent SA (2015). Characterization of proteases and nucleases associated with ethylene-induced programmed cell death in immature cucumber fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 110: 190-196.
- Lehmann T y Ratajczak L (2008). The pivotal role of glutamate dehydrogenase (GDH) in the mobilization of N and C from storage material to asparagine in germinating seeds of yellow lupine. *J. Plant Physiol.* 165: 149-158.
- Leiva-Neto JT, Grafi G, Sabelli PA, Woo YM, Dante RA, Maddock S, Gordon-Kamm WJ y Larkins BA (2004). A dominant negative mutant of cyclin-dependent kinase A reduces endoreduplication but not cell size or gene expression in maize endosperm. *Plant Cell* 16: 1854-1869.
- Lers A, Lomaniec E, Burd S y Khalchitski A (2001). The characterization of LeNUC1, a nuclease associated with leaf senescence of tomato. *Physiol. Plant.* 112: 176-182.
- Lers A, Sonogo L, Green PJ y Burd S (2006). Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission. *Plant Physiol* 142: 710-721.

- Lesniewicz K, Karlowski WM, Pienkowska JR, Krzywkowski P y Poreba E (2013). The plant s1-like nuclease family has evolved a highly diverse range of catalytic capabilities. *Plant Cell Physiol* 54: 1064-1078.
- Lesniewicz K, Pienkowska J y Poreba E (2010). Characterization of nucleases involved in seedling development of cauliflower. *J. Plant Physiol.* 167: 1093-1100.
- Lesniewicz K, Poreba E, Smolarkiewicz M, Wolff N, Stanislawski S y Wojtaszek P (2012). Plant plasma membrane-bound staphylococcal-like DNases as a novel class of eukaryotic nucleases. *BMC Plant Biol* 12: 195.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R y Lamb C (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Li BM, Conway N, Navarro S y Comai L (2005). A conserved and species-specific functional interaction between the Werner syndrome-like exonuclease atWEX and the Ku heterodimer in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 33: 6861-6867.
- Li JR, Yu K, Wei JR, Ma Q, Wang BQ y Yu D (2010). Gibberellin retards chlorophyll degradation during senescence of *Paris polyphylla*. *Biol. Plant.* 54: 395-399.
- Li Q, Feng JX, Han P y Zhu YX (2006). Parental RNA is significantly degraded during *Arabidopsis* seed germination. *J. Integr. Plant Biol.* 48: 114-120.
- Liang Q, Guo L, Gogate S, Karim Z, Hanifi A, Leung DY, Gorska MM y Alam R (2010). IL-2 and IL-4 stimulate MEK1 expression and contribute to T cell resistance against suppression by TGF-beta and IL-10 in asthma. *J Immunol* 185: 5704-5713.
- Lichtenthaler HK (1987). Chlorophylls and carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol.* 148: 350-382.

- Liljeroth E y Bryngelsson T (2002). Earlier onset of DNA fragmentation in leaves of wheat compared to barley and rye. *Hereditas* 136: 108-115.
- Lim PO, Kim HJ y Nam HG (2007). Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* 58: 115-136.
- Lim PO, Lee IC, Kim J, Kim HJ, Ryu JS, Woo HR y Nam HG (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J. Exp. Bot.* 61: 1419-1430.
- Lin JF y Wu SH (2004). Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 39: 612-628.
- Linneo C (1753). *Species plantarum*. A facsimile (1957-1959) of the first edition. (1753). Ray Society, London.
- Liu P, Guo W, Jiang Z, Pu H, Feng C, Zhu X, Peng Y, Kuang A y Little CR (2011). Effects of high temperature after anthesis on starch granules in grains of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Agric Sci* 149: 159-169.
- Liu SH, Fu BY, Xu HX, Zhu LH, Zhai HQ y Li ZK (2007). Cell death in response to osmotic and salt stresses in two rice (*Oryza sativa* L.) ecotypes. *Plant Science* 172: 897-902.
- Lodwig E y Poole P (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *CRC Critical Reviews in Plant Science* 22: 37-78.
- Lombardi L, Ceccarelli N, Picciarelli P y Lorenzi R (2007). DNA degradation during programmed cell death in *Phaseolus coccineus* suspensor. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 221-227.
- López-Fernández MP, Burrieza HP, Rizzo AJ, Martínez-Tosar LJ y Maldonado S (2015). Cellular and molecular aspects of quinoa leaf senescence. *Plant Sci* 238: 178-187.
- López-Pedrouso M, Bernal J, Franco D y Zapata C (2014). Evaluating two-dimensional electrophoresis profiles of the protein phaseolin as markers of genetic differentiation and seed protein quality in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 62: 7200-7208.

- Maekawa K, Tsunasawa S, Dibo G y Sakiyama F (1991). Primary structure of nuclease P1 from *Penicillium citrinum*. Eur J Biochem 200: 651-661.
- Martín SA, Meyer WL y Ullrich RC (1982). Nuclease function and biochemistry in the fungus, *Schizophyllum commune*. J. Cell Biol. 95: A34-A34.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L y Suzuki A (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Ann. Bot. 105: 1141-1157.
- Mason PA y Cox LS (2012). The role of DNA exonucleases in protecting genome stability and their impact on ageing. Age 34: 1317-1340.
- Matsushima R, Tang LY, Zhang L, Yamada H, Twell D y Sakamoto W (2011). A conserved, Mg²⁺-dependent exonuclease degrades organelle dna during *Arabidopsis* pollen development. Plant Cell 23: 1608-1624.
- Mittler R y Lam E (1995). Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity-induced upon hypersensitive response cell-death. Plant Cell 7: 1951-1962.
- Mohlmann T, Bernard C, Hach S y Neuhaus HE (2010). Nucleoside transport and associated metabolism. Plant Biol. 12: 26-34.
- 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.
- Muramoto Y, Watanabe A, Nakamura T y Takabe T (1999). Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. Gene 234: 315-321.
- 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 J. 41: 697-709.

- Nakagawa T, Kaku H, Shimoda Y, Sugiyama A, Shimamura M, Takanashi K, Yazaki K, Aoki T, Shibuya N y Kouchi H (2011). From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant J* 65: 169-180.
- Narumi T, Sudo R y Satoh S (2006). Cloning and characterization of a cDNA encoding a putative nuclease related to petal senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 75: 323-327.
- Naseem I y Hadi SM (1987). Single-strand-specific nuclease of pea seeds glycoprotein nature and associated nucleotidase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 437-445.
- Nonogaki H, Bassel GW y Bewley JD (2010). Germination-Still a mystery. *Plant Science* 179: 574-581.
- Noriega G, Cruz DS, Batlle A, Tomaro M y Balestrasse K (2012). Heme oxygenase is involved in the protection exerted by jasmonic acid against cadmium stress in soybean roots. *J. Plant Growth Regul.* 31: 79-89.
- Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry JF y Masclaux-Daubresse C (2006). The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *J. Exp. Bot.* 57: 547-557.
- Panavas T, LeVangie R, Mistler J, Reid PD y Rubinstein B (2000). Activities of nucleases in senescing daylily petals. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 837-843.

- Panavas T, Pikula A, Reid PD, Rubinstein B y Walker EL (1999). Identification of senescence-associated genes from daylily petals. *Plant Mol Biol* 40: 237-248.
- Pérez-Amador MA, Abler ML, De Rocher EJ, Thompson DM, van Hoof A, LeBrasseur ND, Lers A y Green PJ (2000). Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 169-180.
- Plchova H, Hartung F y Puchta H (2003). Biochemical characterization of an exonuclease from *Arabidopsis thaliana* reveals similarities to the DNA exonuclease of the human Werner syndrome protein. *J. Biol. Chem.* 278: 44128-44138.
- Prinsi B y Espen L (2015). Mineral nitrogen sources differently affect root glutamine synthetase isoforms and amino acid balance among organs in maize. *BMC Plant Biol* 15: 96.
- Quiles FA, Raso MJ, Pineda M y Piedras P (2009). Ureide metabolism during seedling development in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol Plant* 135: 19-28.
- 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 Physiol.* 134: 1598-1613.
- Rantong G, Evans R y Gunawardena A (2015). Lace plant ethylene receptors, AmERS1a and AmERS1c, regulate ethylene-induced programmed cell death during leaf morphogenesis. *Plant Mol.Biol.* 89: 215-227.
- Rasheed Z (2006). Partial purification and characterization of single-strand-specific nucleases from gram and pea seedling. *Seed Technology* 28: 22-35.
- Raso MJ, Muñoz 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*). *Physiol. Plant.* 131: 355-366.
- Rewers M y Sliwinska E (2012). Endoreduplication intensity as a marker of seed developmental stage in the Fabaceae. *Cytometry A* 81: 1067-1075.
- Rewers M y Sliwinska E (2014). Endoreduplication in the germinating embryo and young seedling is related to the type of seedling establishment but is not coupled with superoxide radical accumulation. *J Exp Bot* 65: 4385-4396.
- Robertson GP y Vitousek PM (2009) Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. *Annual Review of Environment and Resources*. Annual Reviews, Palo Alto, pp 97-125.
- Ruan YL, Patrick JW, Bouzayen M, Osorio S y Fernie AR (2012). Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends Plant Sci.* 17: 656-665.
- Sakamoto W y Takami T (2014). Nucleases in higher plants and their possible involvement in DNA degradation during leaf senescence. *J Exp Bot* 65: 3835-3843.
- Santos CN, Alves MM, Bento IT y Ferreira RB (2012). Missing pieces in protein deposition and mobilization inside legume seed storage vacuoles: calcium and magnesium ions. *Seed Sci. Res.* 22: 249-258.
- Santos HP y Buckeridge MS (2004). The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Ann. Bot.* 94: 819-830.
- Sarwat M, Naqvi AR, Ahmad P, Ashraf M y Akram NA (2013). Phytohormones and microRNAs as sensors and regulators of leaf senescence: assigning macro roles to small molecules. *Biotechnol Adv* 31: 1153-1171.

- Sato Y, Morita R, Nishimura M, Yamaguchi H y Kusaba M (2007). Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14169-14174.
- Schubert KR y Boland MJ (1990) *The ureides*. Academic Press, New York
- Seo M, Nambara E, Choi G y Yamaguchi S (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol.Biol.* 69: 463-472.
- Seymour GB, Ostergaard L, Chapman NH, Knapp S y Martin C (2013) Fruit development and ripening. In: Merchant SS (ed) *Annual Review of Plant Biology*, Vol 64. Annual Reviews, Palo Alto, pp 219-241.
- Shan XY, Wang JX, Chua LL, Jiang DA, Peng W y Xie DX (2011). The role of *Arabidopsis* rubisco activase in jasmonate-induced leaf senescence. *Plant Physiol.* 155: 751-764.
- Shishido K y Ando T (1985). [S1 nuclease]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 30: 981-987.
- Shoemaker RC, Polzin K, Labate J, Specht J, Brummer EC, Olson T, Young N, Concibido V, Wilcox J, Tamulonis JP, Kochert G y Boerma HR (1996). Genome duplication in soybean (*Glycine subgenus soja*). *Genetics* 144: 329-338.
- Shutov AD, Baumlein H, Blattner FR y Muntz K (2003). Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. *J. Exp. Bot.* 54: 1645-1654.
- Singh S, Letham DS, Jameson PE, Zhang R, Parker CW, Bandenoch-Jones J y Nooden LD (1988). Cytokinin Biochemistry in Relation to Leaf Senescence: IV. Cytokinin Metabolism in Soybean Explants. *Plant Physiol* 88: 788-794.
- 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. *J. Exp. Bot.* 60: 3587-3594.

- Smith DW, Han MR, Park JS, Kim KR, Yeom T, Lee JY, Kim DJ, Bingman CA, Kim HJ, Jo K, Han BW y Phillips GN (2013). Crystal structure of the protein from *Arabidopsis thaliana* gene At5g06450, a putative DnaQ-like exonuclease domain-containing protein with homohexameric assembly. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 81: 1669-1675.
- Smith PMC y Atkins CA (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* 128: 793-802.
- Soudry E, Ulitzur S y Gepstein S (2005). Accumulation and remobilization of amino acids during senescence of detached and attached leaves: in planta analysis of tryptophan levels by recombinant luminescent bacteria. *J Exp Bot* 56: 695-702.
- Spano C, Buselli R, Ruffini Castiglione M, Bottega S y Grilli I (2007). RNases and nucleases in embryos and endosperms from naturally aged wheat seeds stored in different conditions. *J Plant Physiol* 164: 487-495.
- Sprent J (2002). Knobs, knots and nodules the renaissance in legume symbiosis research. *New Phytologist* 153: 2-6.
- Sreenivasulu K, Raghu P, Ravinder P y Nair KM (2008). Effect of dietary ligands and food matrices on zinc uptake in caco-2 cells: implications in assessing zinc bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10967-10972.
- Stasolla C, Katahira R, Thorpe TA y Ashihara H (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 160: 1271-1295.
- Sugiyama M, Ito J, Aoyagi S y Fukuda H (2000). Endonucleases. *Plant Mol Biol* 44: 387-397.
- Tang LY, Matsushima R y Sakamoto W (2012). Mutations defective in ribonucleotide reductase activity interfere with pollen plastid DNA degradation mediated by DPD1 exonuclease. *Plant J.* 70: 637-649.

- Tang LY y Sakamoto W (2011). Tissue-specific organelle DNA degradation mediated by DPD1 exonuclease. *Plant signaling & behavior* 6: 1391-1393.
- Terce-Laforgue T, Dubois F, Ferrario-Mery S, de Crecenzo MAP, Sangwan R y Hirel B (2004). Glutamate dehydrogenase of tobacco is mainly induced in the cytosol of phloem companion cells when ammonia is provided either externally or released during photorespiration. *Plant Physiol.* 136: 4308-4317.
- Thelen MP y Northcote DH (1989). Identification and purification of a nuclease from *Zinnia elegans* a potential molecular marker for xylogenesis. *Planta* 179: 181-195.
- Thomas H, Ougham HJ, Wagstaff C y Stead AD (2003). Defining senescence and death. *J. Exp. Bot.* 54: 1127-1132.
- 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 (2006). AtAAH encodes a protein with allantoate 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. *J. Exp. Bot.* 57: 5-12.
- Tolleter D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teyssier E, Payet N, Avelange-Macherel MH y Macherel D (2007). Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* 19: 1580-1589.
- Tonini PP, Purgatto E y Buckeridge MS (2010). Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). *Ann Bot* 106: 607-616.

- Triplett EW, Blevins DG y Randall DD (1982). Purification and properties of soybean nodule xanthine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 219: 39-46.
- Triques K, Sturbois B, Gallais S, Dalmais M, Chauvin S, Clepet C, Aubourg S, Rameau C, Caboche M y Bendahmane A (2007). Characterization of *Arabidopsis thaliana* mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J.* 51: 1116-1125.
- Uozumi T, Tamura G y Arima K (1969). Studies on autolysis of *Aspergillus oryzae*. Crystallization and properties of nuclease o. *Agricultural and Biological Chemistry* 33: 645-&.
- Vaddepalli P, Scholz S y Schneitz K (2015). Pattern formation during early floral development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 32: 16-23.
- van der Drift C, de Windt FE y Vogels GD (1970). Allantoate hydrolysis by allantoate amidohydrolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 136: 273-279.
- van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flugge UI y Kunze R (2006). Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* 141: 776-792.
- van der Hoorn RAL (2008). Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 191-223.
- Wagstaff C, Yang TJW, Stead AD, Buchanan-Wollaston V y Roberts JA (2009). A molecular and structural characterization of senescing *Arabidopsis* siliques and comparison of transcriptional profiles with senescing petals and leaves. *Plant J.* 57: 690-705.
- Werner AK, Sparkes IA, Romeis T y Witte CP (2008). Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiol* 146: 418-430.

- Werner AK y Witte CP (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends Plant Sci* 16: 381-387.
- Williams L y Miller A (2001). Transporters Responsible for the Uptake and Partitioning of Nitrogenous Solutes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 659-688.
- Winchcombe CF y Bewley JD (1992). Changes in ribonucleic-acid and polyribosomes as related to ribonuclease-activities during development and germination of the castor bean seed. *Phytochemistry* 31: 2591-2597.
- Wingler A, Purdy S, MacLean JA y Pourtau N (2006). The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 57: 391-399.
- 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. *J. Plant Physiol.* 163: 1207-1220.
- Wolf S, Hematy K y Hofte H (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. In: Merchant SS (ed) *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63. Annual Reviews, Palo Alto, pp 381-407
- Woo HR, Kim HJ, Nam HG y Lim PO (2013). Plant leaf senescence and death regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *J. Cell Sci.* 126: 4823-4833.
- Wood M, Power JB, Davey MR, Lowe KC y Mulligan BJ (1998). Factors affecting single strand-preferring nuclease activity during leaf aging and dark-induced senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 131: 149-159.
- Xu F, Meng T, Li PL, Yu YQ, Cui YJ, Wang YX, Gong QQ y Wang NN (2011). A soybean dual-specificity kinase, gmsark, and its *Arabidopsis*

- homolog, AtSARK, regulate leaf senescence through synergistic actions of auxin and ethylene. *Plant Physiol.* 157: 2131-2153.
- Xu GH, Fan XR y Miller AJ (2012) Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. In: Merchant SS (ed) *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63. Annual Reviews, Palo Alto, pp 153-182.
- Xu Y y Hanson MR (2000). Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiol.* 122: 1323-1333.
- Yang B, Wen X, Kodali NS, Oleykowski CA, Miller CG, Kulinski J, Besack D, Yeung JA, Kowalski D y Yeung AT (2000). Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease. *Biochemistry* 39: 3533-3541.
- Yang M, Liu D y Bolen DW (1999). The peculiar nature of the guanidine hydrochloride-induced two-state denaturation of staphylococcal nuclease: a calorimetric study. *Biochemistry* 38: 11216-11222.
- Yang TF, Gonzalez-Carranza ZH, Maunders MJ y Roberts JA (2008). Ethylene and the regulation of senescence processes in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Ann. Bot.* 101: 301-310.
- Yemm EW y Cocking EC (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst* 80: 209-213.
- Yen Y y Green PJ (1991). Identification and Properties of the Major Ribonucleases of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 97: 1487-1493.
- You MK, Shin HY, Kim YJ, Ok SH, Cho SK, Jeung JU, Yoo SD, Kim JK y Shin JS (2010). Novel bifunctional nucleases, OmBBD and AtBBD1, are involved in abscisic acid-mediated callose deposition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152: 1015-1029.
- Yupsanis T, Eleftheriou P y Kelepiri Z (1996). Separation and purification of both acid and neutral nucleases from germinated alfalfa seeds. *J. Plant Physiol.* 149: 641-649.

- Yupsanis T, Kefalas PS, Eleftheriou P y Kotinis K (2001). RNase and DNase activities in the alfalfa and lentil grown in iso-osmotic solutions of NaCl and mannitol. *J. Plant Physiol.* 158: 921-927.
- Yupsanis T, Symeonidis L, Kalemi T, Moustaka H y Yupsani A (2004). Purification, properties and specificity of an endonuclease from *Agropyron elongatum* seedlings. *Plant Physiol Biochem* 42: 795-802.
- Zaina G, Morassutti C, De Amicis F, Fogher C y Marchetti S (2003). Endonuclease genes up-regulated in tissues undergoing programmed cell death are expressed during male gametogenesis in barley. *Gene* 315: 43-50.
- Zehr BD, Savin TJ y Hall RE (1989). A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 182: 157-159.
- Zhang Y, Butelli E, De Stefano R, Schoonbeek HJ, Magusin A, Pagliarani C, Wellner N, Hill L, Orzaez D, Granell A, Jones JDG y Martin C (2013). Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. *Curr. Biol.* 23: 1094-1100.
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U y Boldt R (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57: 805-836.