

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA, ECOLOGÍA Y FISIOLOGÍA VEGETAL



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL
METABOLISMO DEL ALANTOATO EN JUDÍA
(*PHASEOLUS VULGARIS*)

Tesis Doctoral
Juan Luis Díaz Leal
Córdoba, 2012

TITULO: *CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL METABOLISMO DEL
ALANTOATO EN JUDÍA (PHASEOLUS NVULGARIS).*

AUTOR: *JUAN LUÍS DÍAZ LEAL*

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

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

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA, ECOLOGÍA Y FISIOLÓGIA VEGETAL



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL METABOLISMO DEL
ALANTOATO EN JUDÍA (*PHASEOLUS VULGARIS*)

Memoria presentada por Juan Luis Díaz Leal para optar
al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

Directores

Josefa Muñoz Alamillo
Profesora de Fisiología Vegetal

Manuel Pineda Priego
Catedrático de Fisiología Vegetal



TÍTULO DE LA TESIS: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL METABOLISMO DEL ALANTOATO EN JUDÍA (*PHASEOLUS VULGARIS*)

DOCTORANDO/A: JUAN LUIS DÍAZ LEAL

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

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

El trabajo de Tesis Doctoral de D. Juan Luis Díaz Leal se ha llevado a cabo en el Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal, en el grupo "Biotecnología de plantas superiores y algas verdes" (BIO-115). Durante la realización de la Tesis, el doctorando ha aprendido a utilizar con éxito numerosas técnicas propias de la Fisiología y la Bioquímica Vegetal, así como de Biología Molecular y Genética, necesarias para el desarrollo experimental de la misma. El doctorando ha demostrado una gran capacidad de trabajo, así como una gran vocación y una excelente aptitud ante los retos de la experimentación científica, adquiriendo finalmente una sólida formación no solo en el área de estudio abordada en la Tesis, sino de carácter más general, que lo capacitan para abordar proyectos de investigación con total independencia, abarcando desde el diseño experimental hasta el análisis y puesta en valor de los resultados obtenidos a través de su difusión nacional e internacional.

El trabajo realizado ha permitido desentrañar parte de la ruta de catabolismo de los ureidos, mostrando que la AAH es la enzima que se encarga de la degradación del alantoato en plantas de judía. Además, ha revelado que la regulación de los niveles de ureidos tiene importantes implicaciones fisiológicas en estas plantas. Los resultados obtenidos se han comunicado en varios congresos nacionales e internacionales, y se han difundido en las siguientes publicaciones:

Díaz-Leal J.L., Gálvez-Valdivieso G., Fernández J., Pineda M., Alamillo J.M. (2012). Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* 63: 4095-4106.

Alamillo JM, **Díaz-Leal JL**, Sánchez-Morán M^aV, Pineda M. (2010). Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell & Environment* 33: 1828-1837.

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

Córdoba 25 de septiembre de 2012

Fdo.: Josefa Muñoz Alamillo
Profesora Contratada Doctora

Firma del/de los director/es

Fdo.: Manuel Pineda Priego
Catedrático de Universidad

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

Díaz-Leal J.L., Gálvez-Valdivieso G., Fernández J., Pineda M., Alamillo J.M. (2012). Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* 63: 4095-4106.

Alamillo J.M., **Díaz-Leal J.L.**, Sánchez-Morán M.V., Pineda M. (2010). Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell & Environment* 33: 1828-1837.

Pineda M., Piedras P., Aguilar M., Alamillo J.M., Quiles F.A., Sánchez-Morán M.V., **Díaz-Leal J.L.**, Muñoz A., Gálvez-Valdivieso G., Fernández-Conde M.E., Vera J.M.; Fernández J., Raso M.J., Cardeñosa M.R. (2009). *Biotecnología de plantas superiores y algas verdes. Biotecnología. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba.*

Asimismo se han presentado en los siguientes congresos:

Gil-Quintana E., **Díaz-Leal J.L.**, Pineda M., Arrese-Igor Cesar, Alamillo J.M., González E.M. Metabolismo de ureidos en plantas de soja sometidas a estrés hídrico. XI Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno, Cáceres (España), 2012.

Alamillo J.M., **Díaz-Leal J.L.**, Coletto-Reyes I., Gálvez-Valdivieso G., Pineda M. Implicaciones fisiológicas de la acumulación de ureidos en situaciones de estrés en judía. XI Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno, Cáceres (España), 2012.

Piedras P., Alamillo J.M., Gálvez-Valdivieso G., Aguilar M, Quiles F.A., Cabello-Díaz J.M., **Díaz-Leal J.L.**, Lambert R., Coletto-Reyes I., Jurado L.P., Pineda M. Metabolismo de ureidos en judía (*Phaseolus vulgaris*). V Jornada de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular y Biotecnología, Córdoba (España), 2012.

Alamillo J.M. **Díaz-Leal J.L.**, Pineda M. El estado de desarrollo controla los niveles de ureidos a través de la regulación de la alantoinasa en plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.). X Reunión de Biología Molecular de Plantas, Valencia (España), 2010.

Díaz-Leal J.L., Pineda M., Alamillo J.M. Develomental regulation of ureide metabolisms in French bean (*Phaseolus vulgaris*). XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Valencia (España), 2010.

Díaz-Leal J.L., Pineda M., Alamillo J.M. Regulación del metabolismo de ureidos durante la transición del desarrollo vegetativo a reproductivo en plantas de judía. X Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno, Benalauría (España), 2010.

Alamillo J.M. **Díaz-Leal J.L.**, Coletto-Reyes I., Quiles F.A., Pineda M. Regulación del metabolismo de ureidos por ABA y otras señales de estrés abiótico. XXXIII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular, Córdoba (España), 2010.

Díaz-Leal J.L., Pineda M., Alamillo J.M. Análisis del metabolismo del alantoato durante el desarrollo y en condiciones de déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris*. I Congreso Científico de Investigadores en Formación, Córdoba (España), 2010.

Alamillo J.M. **Díaz-Leal J.L.**, Sánchez-Morán M.V., Pineda M. Drought stress effects on ureide metabolism in *Phaseolus vulgaris*. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. Tampere (Finlandia), 2008.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias al Prof. Manuel Pineda Priego por haberme aceptado en su grupo de investigación y por la ayuda que me ha prestado en todo lo que he necesitado a lo largo de estos años. A la Dra. Josefa Muñoz Alamillo quiero agradecer su dirección y ayuda en este trabajo de tesis. Gracias por enseñarme a ser riguroso y autocrítico en mi trabajo, así como por demostrarme que la forma de resolver los problemas es trabajar con más ahínco aún.

Gracias al Prof. Pedro Piedras Montilla por su buen humor y palabras de aliento. Gracias Juanmi, no sólo por ser un amigo sino también por ser un estupendo compañero de trabajo. Fran, no sé cuantas veces habré discutido contigo algún aspecto del trabajo, gracias por haber estado ahí. Inma, gracias por haber aguantado a este agónías como compañero de laboratorio. Rocío, gracias por tu simpatía y buen humor. Marta, gracias por tener siempre tiempo para ayudarme en cualquier cosa. Vicky, gracias por aguantarme durante dos años lado a lado. Goyi, gracias por tu ayuda en el análisis de expresión por qPCR y por tu compañerismo. Luis, gracias por dejar que acaparase todos los baños del laboratorio. Javi, gracias por tu gran ayuda en el análisis de los aminoácidos.

Quisiera también dar las gracias a Víctor, Isa y Eva, del “grupo de bacterias”, gracias por las charlas durante el almuerzo y por decir que sí siempre que he ido a vuestro laboratorio a pedirlos desde una enzima hasta azúcar para el café. Gracias también a los miembros del “grupo de veterinaria”: no soy capaz de recordar cuántas veces he llegado a pedirlos desde café hasta un reactivo. Asimismo, gracias a Fran y Nico, del “grupo de fresas”, por su ayuda y compañerismo, así como a toda la gente del “grupo de Emilio” por el mismo motivo.

Conchi, gracias por estar ahí siempre que he necesitado solucionar cualquier problema administrativo. Gracias también a Inés por su ayuda en los aspectos administrativos de este trabajo.

Deseo agradecer también a la Dra. Dulcenombre Rodríguez (C.I.F.A., Sevilla, España) por la cepa de rizobio usada en este trabajo, al Dr. Antonio de Ron (M. B. G., Pontevedra, España) por las semillas de judía, a la Prof. Carmen Lluch y al Dr. Francisco Palma (Universidad de Granada, España) por su gran ayuda en la determinación de la fijación de nitrógeno y a la Prof. Eloísa Agüera (Universidad de Córdoba, España) por su ayuda en la determinación de carbohidratos. Dar las gracias también al Prof. Eduardo Cruz Rus (Universidad de Málaga, España) por cedernos el vector *pXCShAStrep*, al Dr. David Baulcombe (Inglaterra) por la construcción *pBIN61:P19*, al Prof. Juan Antonio García (C.N.B., Madrid, España) por la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* y al Prof. Francisco Sánchez (U.N.A.M, México) por la cepa k599 de *A. rhizogenes*. Agradecer también al Prof. C. D. Todd (Universidad de Saskatchewan, Canadá) por su ayuda en la identificación del gen *PvALN.2* y al Prof. Jens Stougaard (Universidad de Aarhus, Dinamarca) por la oportunidad de visitar su laboratorio para aprender diferentes técnicas de transformación de leguminosas.

Cómo no, es preciso dar las gracias a la Consejería de Innovación, Ciencias y Empresa (Junta de Andalucía) por la financiación de mi beca predoctoral (P07-RNM-03307), así como al Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación, a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, y al Ministerio de Ciencia e Innovación por la financiación de este trabajo (BIO-115, AGR01283, BIO2006-09366, AGL2009-11290).

Por último, pero no por ello menos importante, a María Teresa quiero agradecer su apoyo y confianza diaria, incluso cuando ni yo mismo me aguantaba, y a mis padres y a mi hermana su apoyo y ayuda incondicional.

A María Teresa
A mi familia

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	I
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Importancia de las leguminosas para el hombre.....	3
2. Fijación de nitrógeno en leguminosas y su importancia para la agricultura y el medio ambiente	4
3. La judía común (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	5
4. Leguminosas ureídicas y amídicas	6
5. Catabolismo de purinas y síntesis de ureidos	8
6. Catabolismo de ureidos	13
6.1. Catabolismo de la alantoína.....	13
6.2. Catabolismo del alantoato.....	14
6.3. Catabolismo de la ureidoglicina	17
6.4. Catabolismo del ureidoglicolato	18
7. Papel de los ureidos en condiciones de estrés	19
8. Justificación del trabajo que se presenta	21
II. OBJETIVOS	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Reactivos	29
1.1. Productos químicos, kits y enzimas comerciales.....	29
1.2. Oligonucleótidos.....	29
2. Material biológico y condiciones de cultivo	29
2.1. Material vegetal	29
2.1.1. Condiciones de cultivo habituales y recogida de muestras	29
2.1.2. Experimentos fisiológicos.....	31

2.1.2.1. Tratamiento con alopurinol	31
2.1.2.2. Experimentos en condiciones de oscuridad total o parcial.....	31
2.1.2.3. Experimentos en condiciones de déficit hídrico.....	32
2.1.2.4. Tratamientos con hormonas	32
2.1.2.5. Experimentos con alta y baja temperatura.....	33
2.2. Cepas bacterianas.....	33
3. Preparación de células competentes	36
3.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	36
3.2. Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium</i>	37
4. Vectores.....	37
5. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos	39
5.1. Aislamiento y purificación de ADN genómico.....	40
5.1.1. Método Doyle y Doyle (adaptado).....	40
5.1.2. Kits comerciales para la extracción y purificación del ADN genómico ..	41
5.2. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico.....	41
5.2.1. Lisis alcalina y precipitación con isopropanol	41
5.2.2. Kits comerciales para la extracción y purificación de ADN plasmídico..	42
5.3. Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN.....	42
5.4. Aislamiento y purificación de ARN total	42
6. Cuantificación y análisis de pureza de ácidos nucleicos	43
7. Fraccionamiento de ácidos nucleicos	44
6.1. Electroforesis de ADN.....	44
6.2. Electroforesis de ARN	44
8. Ligación de fragmentos de ADN.....	45
9. Transformación de células competentes.....	45
9.1. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	45
9.2. Transformación de células de <i>Agrobacterium</i>	46
10. Escrutinio de las colonias transformantes	46
10.1. Análisis con endonucleasas de restricción.....	47
10.2. Análisis por PCR	47
11. Secuenciación	48
12. Bases de datos y programas informáticos.....	49

13. Separación electroforética de proteínas.....	49
14. Electrotransferencia y análisis por Western blot.....	50
15. Análisis por PCR cuantitativa (qPCR).....	52
15.1. Tratamiento con ADNasa.....	52
15.2. Síntesis de ADNc.....	52
15.3. PCR cuantitativa o en tiempo real.....	53
16. Amplificación del ADNc <i>PvAAH</i>	54
16.1. Síntesis de ADNc mediante el kit <i>SMART-RACE</i>	54
16.2. Amplificación de los fragmento 5´ y 3´-RACE del ADNc <i>PvAAH</i>	55
16.3. Amplificación del ADNc completo del gen <i>PvAAH</i>	56
17. Análisis por Southern blot.....	57
17.1. Digestión del ADN genómico de judía.....	57
17.2. Trasferencia de ADN o Southern blot.....	57
17.3. Fijación del ADN a la membrana de nailon.....	58
17.4. Obtención de sondas marcadas con digoxigenina.....	58
17.5. Hibridación de la membrana.....	59
17.6. Lavados de la membrana.....	59
17.7. Detección de las señales de hibridación.....	59
18. Amplificación de un fragmento de ADN genómico de judía que contiene la secuencia codificante del gen <i>PvAAH</i>	60
19. Amplificación de la región promotora del gen <i>PvAAH</i>	61
19.1. Construcción de librerías de ADN genómico de judía.....	61
19.2. Amplificación de un fragmento de la región promotora del gen <i>PvAAH</i>	62
20. Expresión en <i>Escherichia coli</i> y purificación de la proteína recombinante His ₆ - <i>PvAAH</i>	63
20.1. Clonación de la secuencia codificante del ADNc <i>PvAAH</i> en el vector <i>pET30b</i> ⁺	63
20.2. Expresión y purificación de la proteína His ₆ - <i>PvAAH</i>	64
21. Obtención y purificación de anticuerpos frente a la proteína His ₆ - <i>PvAAH</i>	66
22. Expresión en <i>Nicotiana benthamiana</i> y purificación de la proteína recombinante <i>PvAAH</i> -HA-Strep.....	67

22.1. Clonación de la secuencia codificante del ADNc <i>PvAAH</i> en el vector <i>pXCSHAStrep</i>	67
22.2. Expresión de la proteína PvAAH-HA-Strep en hojas de <i>N. benthamiana</i>	68
22.3. Purificación de la proteína PvAAH-HA-Strep.....	69
23. Silenciamiento del gen <i>PvAAH</i> en judía.....	70
23.1. Obtención de una construcción para silenciamiento génico del gen <i>PvAAH</i> ...	70
23.2. Transformación de plántulas de judía.....	71
24. Determinación de peso seco.....	72
25. Determinación de la fijación de nitrógeno.....	72
26. Determinaciones analíticas.....	73
26.1. Determinación de aminoácidos.....	73
26.2. Determinación de alantoína, alantoato, ureidoglicolato y glioxilato.....	74
26.3. Determinación de amonio y urea.....	76
26.4. Determinación de carbohidratos.....	76
26.4.1. Extracción de carbohidratos.....	77
26.4.2. Determinación de azúcares solubles.....	77
26.4.3. Determinación de almidón.....	78
26.5. Determinación de clorofilas.....	78
26.6. Determinación de nitrato.....	79
26.7. Determinación de proteína.....	79
27. Determinación de actividades enzimáticas.....	80
27.1. Determinación de la actividad alantoinasa.....	80
27.2. Determinación de la actividad catalizadora de la degradación del alantoato...81	
27.2.1. Determinación de la actividad catalizadora de la degradación del alantoato dependiente de fenilhidrazina (PH-alcasa).....	81
27.2.2. Determinación de la actividad catalizadora de la degradación del alantoato independiente de fenilhidrazina (AAH).....	82
27.3. Determinación de actividad uricasa.....	83
28. Determinación de las características bioquímicas de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep.....	84
28.1. Determinación del pH óptimo de ensayo.....	84
28.2. Determinación de la temperatura óptima de ensayo.....	84

28.3. Efecto de diferentes iones metálicos y del EDTA sobre la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep	85
28.4. Determinación de las constantes cinéticas	85
28.5. Efecto del glioxilato sobre la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep	85
IV. RESULTADOS.....	87
1. Identificación y clonación del gen que codifica la enzima alantoato amidohidrolasa de <i>Phaseolus vulgaris</i>	87
1.1. Identificación y clonación del ADNc <i>PvAAH</i>	89
1.2. Determinación del número de copias del gen <i>PvAAH</i> en el genoma de judía ...	91
1.3. Estructura del gen <i>PvAAH</i> en el genoma de judía	94
1.4. Análisis de la región promotora del gen <i>PvAAH</i>	95
2. Caracterización de la enzima alantoato amidohidrolasa de judía	97
2.1. Expresión en <i>Escherichia coli</i> y purificación de la proteína recombinante His ₆ -PvAAH	99
2.2. Inmunodetección de la proteína PvAAH	100
2.3. Expresión en <i>Nicotiana benthamiana</i> y purificación de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep	101
2.4. Actividad enzimática de la proteína PvAAH-HA-Strep	104
2.5. Caracterización de la enzima PvAAH-HA-Strep	108
2.6. Expresión de la proteína PvAAH en tejidos de <i>P. vulgaris</i>	111
2.7. Silenciamiento génico de la enzima <i>PvAAH</i> en <i>P. vulgaris</i>	114
3. Regulación del metabolismo de los ureidos a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	117
3.1. Cambios en el contenido de ureidos a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	119
3.2. Evolución de la fijación de nitrógeno a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i> ..	122
3.3. Cambios en la expresión de los genes involucradas en el metabolismo de los ureidos en nódulos a lo largo del desarrollo de judía.....	123
3.4. Cambios en la expresión y actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de los ureidos en raíces, tallos y hojas a lo largo del desarrollo de judía.....	124

3.4.1. Expresión y actividad de la enzima alantoinasa en raíces, tallos y hojas a lo largo del desarrollo de judía	124
3.4.2. Expresión y actividad de las enzimas involucradas en la degradación del alantoato a lo largo del desarrollo de judía.....	126
3.5. Contenido de ureidos y actividad alantoinasa en hoja primaria y hoja superior a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	129
3.6. Cambios en el contenido de aminoácidos, ureidos y nitrato en el xilema a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	130
4. Regulación del metabolismo del alantoato en <i>P. vulgaris</i> por otros factores exógenos y endógenos.....	135
4.1. Cambios en el metabolismo de los ureidos durante la transición de la fase vegetativa a la reproductiva en <i>P. vulgaris</i>	137
4.2. Cambios en el contenido de carbohidratos en plantas noduladas de judía y fertilizadas con nitrato.....	138
4.3. Efecto de los ciclos de luz y oscuridad en el contenido de ureidos en <i>P. vulgaris</i>	142
4.4. Efecto de la oscuridad en el contenido de ureidos en <i>P. vulgaris</i>	142
4.5. Regulación del metabolismo de los ureidos en condiciones de oscuridad parcial en judía.....	145
4.6. Fijación de nitrógeno en plantas de judía sometidas a oscuridad parcial.....	147
4.7. Cambios en los niveles de carbohidratos en hojas de plantas de judía sometidas a oscuridad parcial	148
4.8. Regulación del catabolismo del alantoato en <i>P. vulgaris</i> por estrés hídrico.....	150
4.9. Regulación de la expresión del gen <i>PvAAH</i> por ABA, JA, SA y choque térmico	150
V. DISCUSIÓN.....	155
1. Identificación del gen de la enzima alantoato amidohidrolasa de judía	157
2. Caracterización bioquímica de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep y determinación de la actividad alantoato amidohidrolasa en tejidos de judía.....	159
3. Silenciamiento génico del gen <i>PvAAH</i> en judía	164

4. Regulación del metabolismo del alantoato.....	166
4.1. Cambios en el metabolismo del alantoato a lo largo del desarrollo de judía.....	166
4.2. Regulación del metabolismo del alantoato por luz y oscuridad.....	175
4.3. Regulación del metabolismo del alantoato por diferentes tipos de estrés.....	176
VI. CONCLUSIONES.....	181
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	185

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Catabolismo de las purinas en plantas	11
Tabla 1. Cepas bacterianas	34
Tabla 2. Vectores.....	38
Tabla 3. Parejas de oligonucleótidos usados para el escrutinio de bacterias mediante análisis por PCR y para secuenciación.....	48
Tabla 4. Cebadores usados para el análisis mediante PCR cuantitativa.....	54
Figura 2. Secuencia de nucleótidos del ADNc y secuencia deducida de aminoácidos de la alantoato amidohidrolasa de judía PvAAH	90
Figura 3. Distancias filogenéticas entre diferentes AAHs de plantas, algas y bacterias	92
Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína PvAAH de judía y las AAHs de soja, <i>Arabidopsis</i> y <i>E. coli</i>	93
Figura 5. Análisis por Southern blot del gen <i>PvAAH</i>	94
Figura 6. Estructura del gen <i>PvAAH</i> en el genoma de judía	95
Figura 7. Promotor del gen <i>PvAAH</i>	96
Figura 8. Expresión y purificación de la proteína recombinante His ₆ -PvAAH.....	100
Figura 9. Análisis por Western blot de la expresión de la proteína PvAAH.....	101
Figura 10. Expresión y purificación de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep.....	103
Figura 11. Actividad enzimática y estequiometría en la reacción catalizada por la proteína PvAAH-HA-Strep	105
Figura 12. Actividad catalizadora de la degradación del alantoato y contenido de proteína en las fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína PvAAH-HA-Strep	107
Figura 13. Determinación del pH y la temperatura de ensayo de la reacción catalizada por la proteína PvAAH-HA-Strep.....	108
Tabla 5. Efecto del manganeso, zinc y EDTA sobre la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep	109
Figura 14. Cinética enzimática de la proteína PvAAH-HA-Strep	110
Figura 15. Efecto del glioxilato sobre la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep.....	111
Figura 16. Incremento en la concentración de amonio y glioxilato en el ensayo de actividad de la enzima PvAAH en diferentes tejidos de <i>P. vulgaris</i>	112

Figura 17. Actividades de la degradación enzimática del alantoato, expresión del gen <i>PvAAH</i> y niveles de alantoato en tejidos de <i>P. vulgaris</i>	114
Figura 18. Efecto del silenciamiento de la expresión del gen <i>PvAAH</i> en raíces de judía.....	116
Tabla 6. Parámetros de crecimiento de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno o fertilizadas con nitrato	120
Figura 19. Contenido en ureidos a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	121
Figura 20. Evolución de la fijación de nitrógeno, actividad uricasa y contenido de ureidos en nódulos a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	122
Tabla 7. Peso fresco y peso seco de nódulos por planta a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	123
Figura 21. Expresión relativa del ARNm de los genes <i>PvUO</i> , <i>PvALN.1</i> , <i>PvALN.2</i> y <i>PvAAH</i> en nódulos a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	124
Figura 22. Expresión relativa del gen <i>PvALN.1</i> en raíces, tallos y hojas trifoliadas a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	125
Figura 23. Actividad alantoinasa en raíces, tallos y hojas trifoliadas a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	126
Figura 24. Expresión relativa del gen <i>PvAAH</i> en raíces, tallos y hojas trifoliadas a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	127
Figura 25. Actividades degradadoras de alantoato en hojas trifoliadas a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	128
Figura 26. Contenido de ureidos y actividad alantoinasa en hoja primaria y hoja superior a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	130
Figura 27. Contenido de aminoácidos y ureidos en el xilema a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	132
Tabla 8. Distribución de los compuestos nitrogenados en el xilema a lo largo del desarrollo de <i>P. vulgaris</i>	133
Figura 28. Estado de floración y contenido de ureidos en plantas noduladas y fertilizadas con nitrato.....	137
Figura 29. Efecto del alopurinol sobre la floración y el contenido de ureidos en plantas noduladas de judía	139
Figura 30. Contenido de azúcares al comienzo de la floración en <i>P. vulgaris</i>	140

Tabla 9. Biomasa, tamaño de hojas y contenido de proteína soluble total y clorofilas en hojas de plantas de judía noduladas o fertilizadas con nitrato.....	141
Figura 31. Contenido de azúcares en hojas de <i>P. vulgaris</i> a lo largo del desarrollo	142
Figura 32. Contenido de ureidos en hojas de <i>P. vulgaris</i> durante la fase de luz y oscuridad del fotoperiodo.....	143
Figura 33. Efecto de la oscuridad sobre el contenido de ureidos	144
Figura 34. Contenido de ureidos en plantas noduladas de judía mantenidas en oscuridad parcial	146
Figura 35. Actividad alantoinasa en plantas noduladas de judía sometidas a oscuridad parcial	146
Figura 36. Actividades catalizadoras de la degradación del alantoato en hojas trifoliadas de plantas de judía sometidas a oscuridad parcial	147
Figura 37. Tasa de fijación de nitrógeno, peso fresco y contenido de ureidos en nódulos en plantas de <i>P. vulgaris</i> sometidas a oscuridad parcial.....	148
Figura 38. Contenido en carbohidratos en hojas trifoliadas de plantas de judía mantenidas en oscuridad parcial.....	149
Figura 39. Actividades catalizadoras de la degradación del alantoato en hojas trifoliadas de <i>P. vulgaris</i> en respuesta al estrés hídrico.....	151
Figura 40. Cambios en la expresión del gen <i>PvAAH</i> por ABA, JA, SA, choque térmico y baja temperatura en <i>P. vulgaris</i>	152
Figura 41. Cambios en el contenido de ureidos por ABA, JA, SA, choque térmico y baja temperatura en hojas de <i>P. vulgaris</i>	153

ABREVIATURAS

A	absorbancia
AAH	alantoato amidohidrolasa
ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
APS	persulfato de amonio
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	trifosfato de adenosina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
BrEt	bromuro de etidio
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
dATP	trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	trifosfato de desoxicitidina
dGTP	trifosfato de desoxiguanosina
dNTPs	trifosfato de desoxinucleótidos
DO	densidad óptica
DOC	desoxicolato sódico
DPS	días tras la siembra
DTT	1, 4-ditiotreitol
dTTP	trifosfato de desoxitimidina
dUTP	trifosfato de desoxiuridina
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
EST	<i>expressed sequence tag</i> (fragmento de secuencia expresada)
FBN	fijación biológica del nitrógeno
<i>g</i>	aceleración de la gravedad

GS/GOGAT	ciclo de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
Ig	inmunoglobulina
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactósido
JA	ácido jasmónico
kDa	kiloDalton
kb	kilobase
Km	constante de Michaelis-Menten
LB	medio de Luria-Bertani
mA	miliAmperio
MES	ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
NADH	nicotín adenín dinucleótido reducido
NBT	azul de tetrazolio (nitroblue tetrazolium)
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PF	peso fresco
PH-alcasa	actividad catalizadora de la degradación del alantoato dependiente de fenilhidrazina
PPD	foforofenildiamidato
PS	peso seco
PVDF	polivinilideno
p:v	peso:volumen
qPCR	PCR cuantitativa
RACE	amplificación rápida de extremos de ADNc
rpm	revoluciones por minuto
RT	retrotranscripción
RT-PCR	retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
SA	ácido salicílico

SDS	dodecil-sulfato sódico
SOB	<i>super optimal broth</i> (medio de cultivo super óptimo)
TB	<i>transformation buffer</i> (tampón de transformación)
Tea	Trietanolamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
Tm	<i>melting temperature</i> (temperatura de fusión)
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	ultravioleta
V	voltios
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

En plantas, la degradación del alantoato es un paso indispensable para el reciclaje de las bases nitrogenadas. Además, en las leguminosas tropicales, como judía y soja, los ureidos alantoína y alantoato son las formas mayoritarias de transporte del nitrógeno fijado y su acumulación se ha relacionado con la inhibición de la fijación de nitrógeno en condiciones de sequía.

En este trabajo se ha identificado y caracterizado una alantoato amidohidrolasa (PvAAH) en judía. Los resultados obtenidos tras bloquear mediante RNAi la expresión de esta proteína sugieren que la AAH es la enzima responsable de la degradación del alantoato en judía. El análisis del metabolismo del alantoato en plantas de judía mostró un incremento en el contenido de ureidos en las partes aéreas de la planta durante la etapa reproductiva del desarrollo, tanto en plantas noduladas como en plantas sin nódulos, así como en plantas sometidas a oscuridad. Este incremento de ureidos se correlacionó con el aumento de la actividad alantoinasa en los tallos, regulada a nivel transcripcional, y con el descenso de la actividad PvAAH en las hojas. Además, en ambas situaciones, el aumento en los niveles de ureidos se acompañó con un incremento en los niveles de glucosa y almidón en las hojas. Asimismo, se observó un descenso en la actividad PvAAH en hojas de plantas sometidas a déficit hídrico y un aumento en la expresión del gen PvAAH en respuesta a diferentes hormonas relacionadas con la respuesta a estrés.

SUMMARY

Allantoate degradation is an essential step for recycling purine-ring nitrogen in all plants. Furthermore, in tropical legumes, as common bean and soybean, the ureides allantoin and allantoate are the mayor transport form of fixed nitrogen and ureide accumulation has been related with the inhibition of nitrogen fixation under drought conditions.

In this work, an allantoate amidohydrolase (PvAAH) enzyme from common bean has been identified and characterized. The results obtained after blocking PvAAH expression using RNAi suggest that the PvAAH is the enzyme responsible for degrading allantoate in common bean. The analysis of the allantoate metabolism in common bean plants showed an increase in the ureide content in the aerial tissues during the reproductive developmental stage both, in nodulated and nonnodulated plants, as well as in plants subjected to darkness. This increase of ureides was correlated with an increase of the allantoinase activity in the stems, regulated at transcriptional level, and with a decrease of the PvAAH activity in the leaves. In addition, in both situations, ureide accumulation was accompanied by an increase in glucose and starch in leaves. Likewise, a decrease in the PvAAH activity was observed in leaves of plants submitted to water deficit, and the expression of the PvAAH gene was induced in plants treated with several stress-related phytohormones.

I. INTRODUCCIÓN

1. Importancia de las leguminosas para el hombre

La familia de las leguminosas (*Fabaceas*) está compuesta por más de 670 géneros y 18.000 especies. Las leguminosas son la tercera familia más grande de plantas con flor (Polhill *et al.*, 1981), y la segunda más importante desde un punto de vista económico, ya que representan aproximadamente el 27% de la producción vegetal mundial (Graham y Vance, 2003). Atendiendo a su uso, las leguminosas cultivadas se clasifican en leguminosas forrajeras, de las que se aprovechan sus hojas y tallos, y leguminosas de grano, de las que se aprovechan principalmente sus semillas.

Las leguminosas aportan cerca de un tercio de la proteína para consumo humano a nivel mundial, además de constituir una fuente importante para piensos y forrajes para animales, así como para la producción de aceite para consumo humano y para uso industrial (Graham y Vance, 2003). Además, las leguminosas acumulan diversos metabolitos secundarios con propiedades beneficiosas para la salud humana, como por ejemplo los isoflavonoides (Dixon y Sumner, 2003).

La familia de las leguminosas presenta una gran diversidad y sus miembros se clasifican en las subfamilias *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* y *Papilionoideae*. Dentro de la subfamilia *Papilionoideae* se encuentran casi todas las leguminosas económicamente importantes, como soja (*Glycine max*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), frijol chino (*Vigna radiata*), garbanzo (*Cicer arietinum*), lenteja (*Lens culinaris*), judía (*Phaseolus vulgaris*), guisante (*Pisum Sativum*) y alfalfa (*Medicago sativa*). Con la excepción del cacahuete, todas estas leguminosas se agrupan en dos “clades” diferentes, *Galegoid* y *Phaseoloid*, clasificadas frecuentemente como leguminosas de climas templados y tropicales, respectivamente (Doyle y Luckow, 2003).

Una de las características más importantes de las leguminosas es su capacidad para formar nódulos en asociación con rizobios y fijar el nitrógeno atmosférico, lo que es de extraordinaria importancia para los ecosistemas terrestres.

2. Fijación de nitrógeno en leguminosas y su importancia para la agricultura y el medio ambiente

Las plantas asimilan el nitrógeno preferentemente en forma de nitrato y amonio. Sin embargo, en condiciones de déficit de nitrógeno, las leguminosas pueden utilizar N_2 atmosférico gracias a la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de N_2 , denominadas en conjunto rizobios.

Los rizobios son un grupo filogenéticamente heterogéneo de más de 70 especies de α - y β -proteobacterias que poseen la capacidad de fijar el N_2 atmosférico en simbiosis con las leguminosas (Sawada *et al.*, 2003). En la mayoría de los casos, esta asociación es específica entre una o varias especies de rizobio y una planta hospedadora. En general, las leguminosas del género *Phaseolus* se encuentran formando simbiosis con diversas bacterias del género *Rhizobium*, como *R. leguminosarum* bv *phaseoli* (Dangeard, 1926), *R. etli*, (Segovia *et al.*, 1993), *R. gallicum* (Amarger *et al.*, 1997) y *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991), mientras que *Glycine max* forma simbiosis con diversas especies de *Bradyrhizobium*, como *B. japonicum*, (Jordan, 1982), *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) y *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995a). Asimismo, varias especies de leguminosas de los géneros *Medicago* y *Acacia* forman simbiosis con bacterias fijadoras de N del género *Sinorhizobium* (Dangeard, 1926; Toledo *et al.*, 2003) y otras como *Cicer arietinum* y *Lotus corniculatus* con especies de rizobio del género *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1982; Nour *et al.*, 1994).

En esta asociación, la planta hospedadora suministra ácidos carboxílicos (principalmente malato) como fuente de energía para la bacteria y, a cambio, ésta suministra a la planta amonio como fuente de nitrógeno.

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN) se lleva a cabo por el complejo enzimático nitrogenasa en los nódulos, que son estructuras especializadas que se forman en la raíz de la planta hospedadora tras ser infectada por los rizobios. Dentro de los nódulos, la nitrogenasa de los bacteroides reduce el N_2 atmosférico hasta NH_4^+ , que ya puede ser utilizado por la planta. El

nitrógeno fijado en forma de NH_4^+ es rápidamente asimilado, a través del ciclo GS/GOGAT, en forma de glutamina y glutamato. Posteriormente, la glutamina actúa como donador de nitrógeno para la síntesis del resto de compuestos nitrogenados, y como compuesto de transporte de nitrógeno al resto de la planta (Schubert, 1986).

Smil (1999) estimó que las leguminosas cultivadas fijan anualmente entre 40 y 60 millones de toneladas métricas de N_2 atmosférico, cuya sustitución por fertilizantes nitrogenados podría suponer un coste de entre 7 y 10 mil millones de dólares. No obstante, pese a sus beneficios, aún son muchos los factores que limitan la fijación de nitrógeno, como la sequía (Sinclair *et al.*, 1987), la acidez del suelo (Whelan y Alexander, 1986), la limitaciones de nutrientes (O'hara *et al.*, 1988), el exceso de fertilización con nitrógeno inorgánico (McClure y Israel, 1979), así como la baja eficiencia de este proceso en algunas especies, entre las que se encuentra la judía (Graham y Rosas, 1977; Graham, 1981; Zahran, 1999).

3. La judía común (*Phaseolus vulgaris*)

La judía común pertenece al género *Phaseolus* y recibe el nombre científico de *Phaseolus vulgaris* L. (Linneo, 1753). Su enclave taxonómico es: Clase *Dicotyledoneae*, Subclase *Rosidae*, Superorden *Fabanae*, Orden *Fabales*, Familia *Fabaceae* y Subfamilia *Papilionoidae* (Strasburger, 1994).

P. vulgaris es una planta autógama, con un genoma relativamente pequeño (650 Mbp), diploide, con 11 cromosomas ($2n = 22$) y en cuyo genoma 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).

Hasta el momento se han descrito más de 400 especies en el género *Phaseolus* (Freytag y Debouck, 2002), de las cuales cinco han sido domesticadas: *P. vulgaris* L. (judía común), *P. lunatus* L. (judía de Lima), *P. coccineus* L. (judía escarlata), *P. polyanthus* Greenman y *P. acutifolius* A. Gray (judía tépari). De

ellas, *P. vulgaris* es la especie más importante, ya que ocupa el 80% de la superficie cultivada con este género (Singh, 1992; Smil, 1999).

Las variedades de judía común actualmente cultivadas son el resultado de un proceso de domesticación y evolución a partir de una forma silvestre procedente de dos áreas geográficas del continente americano: zona Mesoamericana y zona Andina (Gentry, 1969; Kaplan, 1981; Brücher, 1988). Singh y col. (1991) dividieron estos dos acervos o grupos de germoplasma en seis razas: germoplasma Andino (razas Chile, Nueva Granada y Perú) y germoplasma Mesoamericano (razas Durango, Jalisco y Mesoamérica). Los cultivares comerciales de mayor importancia económica pertenecen a las razas Durango, Mesoamérica y Nueva Granada. Dentro de la raza Durango se encuentra la variedad Great Northern, de gran importancia en Estados Unidos y Canadá y que se exportó a Europa para uso comercial de la semilla (judía de grano).

En este trabajo se usó la variedad de *P. vulgaris* Great Northern cv. Matterhorn (PMB-0220). Esta variedad de judía es una planta anual con un ciclo de vida relativamente corto. Su hábito de crecimiento es indeterminado erecto (Debouch y Hidalgo, 1984), lo que indica que el tallo es generalmente erecto sin aptitud trepadora y con terminación en una guía corta, la planta no cesa su crecimiento en la etapa de floración aunque lo hace a un menor ritmo, produce pocas ramas, que son cortas y carecen también de guías y normalmente tienen entre 10 y 12 nudos.

4. Leguminosas ureídicas y amídicas

Las leguminosas pueden transportar el nitrógeno fijado en los nódulos radicales bien en forma de amidas (leguminosas amídicas) o en forma de ureidos (leguminosas ureídicas). Las leguminosas amídicas transportan el nitrógeno fijado principalmente como asparragina y glutamina, independientemente de si el N proviene de la FBN o de la fertilización con nitrato o amonio. Por el contrario, en las leguminosas ureídicas los principales compuestos de transporte de

nitrógeno son los ureidos alantoato y alantoína, aunque esto sólo ocurre cuando el N proviene de la FBN (Schubert, 1986). Entre las leguminosas amídicas se encuentra el guisante, el haba, el altramuza, *Lotus*, la alfalfa, la lenteja y el garbanzo. Estas plantas son leguminosas originarias de climas templados y, excepto *Lotus*, que posee nódulos determinados, la mayoría posee nódulos indeterminados, por lo que habitualmente estas características se asocian con las leguminosas amídicas. Entre las leguminosas ureídicas se encuentran la soja, la judía, el caupi y el frijol chino. A diferencia de las leguminosas amídicas, la mayoría de las leguminosas ureídicas son originarias de climas tropicales o subtropicales y poseen nódulos determinados (Atkins, 1991).

En condiciones de FBN, en leguminosas ureídicas, como soja o *Vigna unguiculata*, los ureidos pueden constituir alrededor del 85% de la fracción nitrogenada del xilema (McClure y Israel, 1979; McClure *et al.*, 1980), mientras que cuando estas plantas se fertilizan con nitrato, la asparragina, glutamina y el nitrato sustituyen a los ureidos como las formas mayoritarias de transporte del nitrógeno (McClure y Israel, 1979; McClure *et al.*, 1980; Pate *et al.*, 1980; Peoples *et al.*, 1985a; 1985b). Este hecho, junto con el efecto negativo que produce la fertilización con N inorgánico sobre la FBN (McClure y Israel, 1979; McClure *et al.*, 1980), han hecho que se asuma que sólo es posible encontrar altas concentraciones de ureidos en leguminosas ureídicas que estén fijando nitrógeno de forma activa. De hecho, la determinación del contenido de ureidos en tallos y peciolos de estas plantas se ha usado para estimar la tasa de fijación de nitrógeno en diferentes especies de leguminosas ureídicas (McClure *et al.*, 1980; Pate *et al.*, 1980; Herridge, 1982; Patterson y LaRue, 1983). Sin embargo, diferentes trabajos han mostrado que el desarrollo de la planta tiene una fuerte influencia sobre los niveles de ureidos en el xilema y en las hojas de las plantas ureídicas (Schubert, 1981; Herridge y Peoples, 1990; Aveline, 1995). Además, varios autores han observado concentraciones anormalmente elevadas de ureidos en especies típicamente amídicas (Atkins, 1991), así como en plantas no leguminosas

(Schubert y Boland, 1990), demostrando que en determinadas condiciones se pueden generar cantidades significativas de ureidos a partir de fuentes distintas a la FBN, probablemente procedentes del reciclaje de proteína y ácidos nucleicos (Zrenner *et al.*, 2006; Brychkova *et al.*, 2008).

La principal ventaja que se atribuye a los ureidos, en comparación con las amidas, es su baja relación C:N, que es de 1 C por cada N en el caso de la alantoína y el alantoato, frente a 2 C por cada N de la asparragina y 2,5 en la glutamina. Esta menor relación C:N hace a los ureidos unas moléculas idóneas tanto para el transporte de nitrógeno como para su almacenamiento, de acuerdo con una mejor economía de carbono para la planta. Por otra parte, se ha estimado que a pesar de la complejidad de la ruta de síntesis de los ureidos, el coste en ATP y poder reductor por molécula de N asimilado no es muy diferente para la síntesis de una molécula de ureidos o de amidas (Smith y Atkins, 2002). No obstante, tanto la alantoína como el alantoato son menos solubles que las amidas. Diferentes autores han sugerido que esta podría ser la causa de que los ureidos se usen como moléculas de transporte en las plantas ureídicas, en su mayoría plantas originarias de climas tropicales, donde la disponibilidad de agua es mayor y por tanto esta menor solubilidad no representaría una desventaja considerable (Sprent y Embrapa, 1980; Schubert y Boland, 1990).

5. Catabolismo de las purinas y síntesis de los ureidos

Los ureidos se producen por oxidación enzimática de las purinas. En las leguminosas ureídicas, los ureidos proceden principalmente de la síntesis de *novo* de purinas en los nódulos radicales de estas plantas (Schubert, 1986; Atkins *et al.*, 1997). No obstante, las purinas que dan lugar a la síntesis de los ureidos también pueden sintetizarse a partir del reciclaje de aminoácidos, o provenir directamente del reciclaje de los ácidos nucleicos. Estos procesos de reciclaje cobran una especial importancia durante diferentes momentos del ciclo de vida de la planta, como la germinación, la senescencia (Masclaux *et al.*, 2000; 2010), el llenado de

las semillas y el desarrollo de los órganos de reserva (Revisado por Zrenner *et al.*, 2006).

En las plantas, la mayoría del N reducido se encuentra formando parte de las proteínas en las hojas, principalmente de la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisco). No obstante, una parte importante del mismo (8-19%) se encuentra formando parte de los ácidos nucleicos (Peoples y Dalling, 1988), que suponen, por tanto, una parte relevante del N total de la planta.

El metabolismo del nitrógeno en plantas y animales se diferencia en un aspecto fundamental: mientras que en plantas el nitrógeno es un recurso escaso, que a menudo limita el crecimiento y la reproducción de las plantas, en los animales es un elemento que habitualmente se encuentra en exceso, por lo que han de eliminarlo en forma de diversos compuestos, antes de que estos alcancen concentraciones que sean tóxicas para la célula. Esta diferencia se refleja en el catabolismo de las purinas. Las plantas son capaces de degradar completamente las purinas hasta dar lugar a glioxilato y amonio, compuestos que a continuación serán reciclados para sintetizar nuevas moléculas orgánicas. Por el contrario, en animales, las purinas sólo se degradan parcialmente y el exceso de nitrógeno es excretado en forma de purinas. Por ejemplo, en primates (incluido el hombre), perros Dalmata, pájaros y muchos reptiles, el ácido úrico es el producto final de la degradación de las purinas, mientras que en otros mamíferos lo es la alantoína (Vogels y van der Drift, 1976; Nelson y Cox, 2008). Una estimación somera del nitrógeno que es excretado en forma de purinas por los animales puede dar idea de la relevancia cuantitativa de la degradación de las purinas hasta sus productos finales, que tiene lugar en las plantas y muchos microorganismos.

El catabolismo de las purinas comprende más de 10 pasos enzimáticos en los que están involucrados procesos de desfosforilación de nucleótidos, hidrólisis de sus correspondientes nucleósidos y desaminación y oxidación de las bases purínicas (Zrenner *et al.*, 2006). El primer intermediario común en la degradación de todas las bases purínicas es la xantina (Figura 1). Este compuesto es oxidado a

ácido úrico por la xantina deshidrogenasa (XDH, EC 1.17.1.4) (Triplett *et al.*, 1982). Esta enzima utiliza NAD^+ como aceptor de electrones, aunque se ha descrito que en ausencia de NAD^+ las XDHs de *Arabidopsis* y tomate también pueden usar O_2 como aceptor de electrones, produciendo el radical superóxido en la reacción (actividad xantina oxidasa) (Hesberg *et al.*, 2004; Yesbergenova *et al.*, 2005). En cambio, a diferencia de las enzimas de *Arabidopsis* y tomate, la XDH de trigo carece de actividad xantina oxidasa (Montalbini, 1998). No obstante, no parece que la actividad xantina oxidasa sea relevante *in vivo*, dada la abundancia del NAD^+ en la célula (Zarepour *et al.*, 2010). La enzima XDH también puede funcionar como NADH oxidasa, generando superóxido, usando O_2 como aceptor de electrones y NADH, en lugar de xantina, como donador (Pérez-Vicente *et al.*, 1987; Sandalio *et al.*, 1988; Yesbergenova *et al.*, 2005; Zarepour *et al.*, 2010). La enzima XDH se localizó originariamente en el citoplasma (Datta *et al.*, 1991). No obstante, los resultados obtenidos por otros autores muestran que esta enzima se encuentra en el peroxisoma (Sandalio *et al.*, 1988; Corpas *et al.*, 2008).

A continuación de la XDH, la enzima uricasa o urato oxidasa (UO, EC 1.7.3.3) cataliza la oxidación del ácido úrico a 5-hidroxiisourato (HIU), con la reducción de oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno. La uricasa es una enzima localizada en el peroxisoma, y es un homotetrámero compuesto por subunidades de aproximadamente 35 kDa, cada una con un sitio activo que participa en la reacción (Rainbird y Atkins, 1981; Alamillo *et al.*, 1991; Gabison *et al.*, 2008). En leguminosas ureídicas el gen de la uricasa se expresa mayoritariamente en los nódulos, donde se produce gran cantidad de esta enzima (2% de la proteína total del nódulo) asociada al proceso de la fijación de nitrógeno, por lo que la uricasa se considera una nodulina tardía (nodulina-35) (Bergman *et al.*, 1983; Capote-Maínez y Sánchez, 1997). Durante décadas se creyó que la uricasa catalizaba la oxidación directamente de ácido úrico a

alantoína (Reynolds *et al.*, 1982). En realidad, esta oxidación transcurre en tres pasos secuenciales catalizados por las tres enzimas correspondientes (Figura 1).

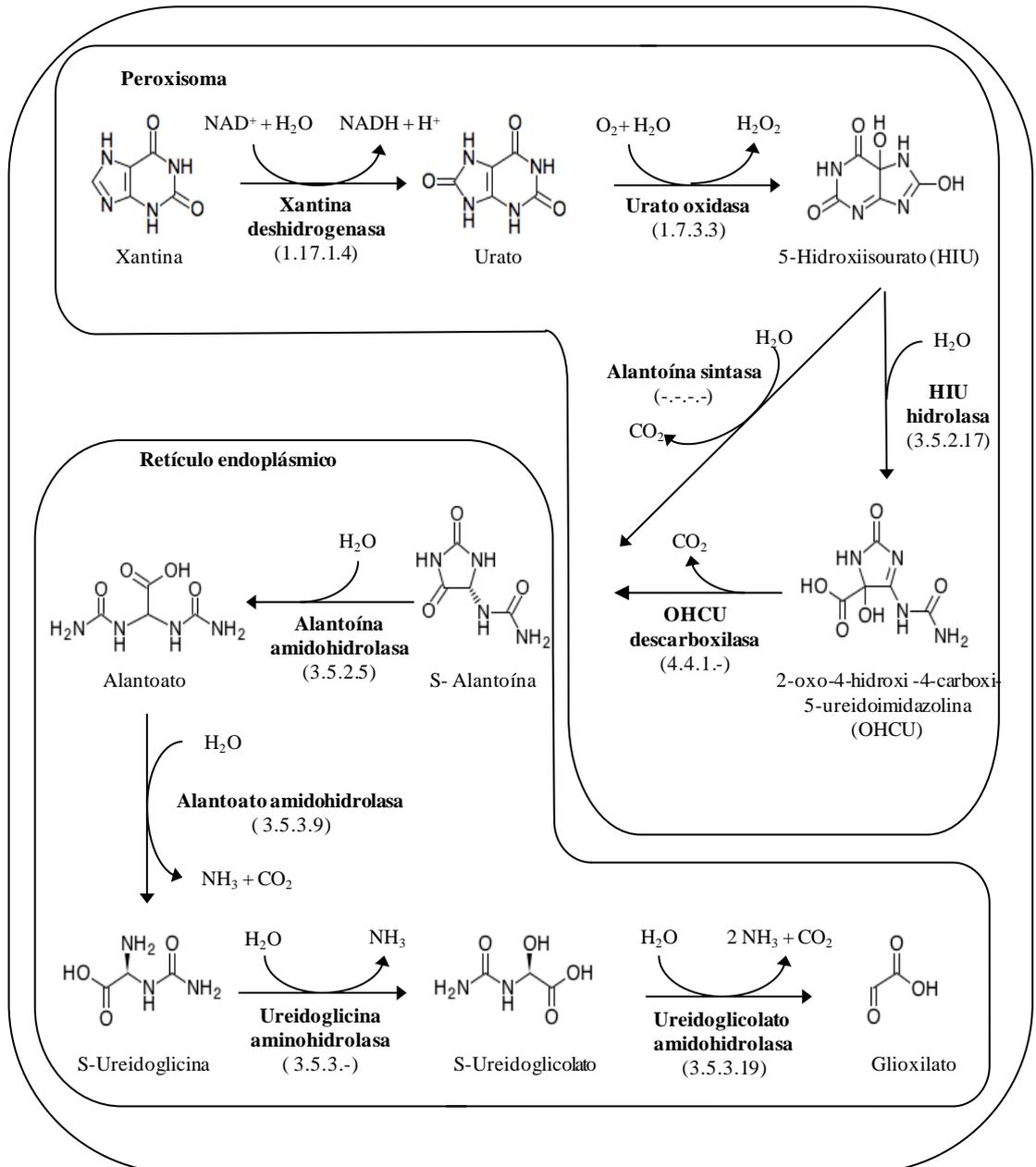


Figura 1. Catabolismo de las purinas en plantas. Modificado a partir de Werner y Witte (2011).

El producto de la uricasa, el HIU puede hidrolizarse espontáneamente a 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina (OHCU). Sin embargo, a pH neutro el OHCU tiene una vida relativamente larga *in vitro*, lo que sugiere que *in vivo* esta reacción estará probablemente catalizada por una enzima (Kahn y Tipton, 1997; 1998).

Sarma y col. (1999) purificaron una HIU hidrolasa de nódulos de soja, que cataliza la hidrólisis del HIU a OHCU y, posteriormente, Raychaudhuri y Tipton (2002) clonaron su gen y localizaron a esta enzima en el peroxisoma de las células no infectadas de los nódulos. Estos autores observaron que *in vitro* el OHCU se descompone espontáneamente dando lugar a una mezcla racémica de S- y R-alantoína, mientras que el producto *in vivo* de la degradación del ácido úrico es la S-alantoína (Vogels y van der Drift, 1976), lo que sugería que esta reacción también debe estar catalizada por una enzima. Ramazzina y col. (2006) identificaron en ratón (*Mus musculus*) dos genes que codifican una HIU hidrolasa y una OHCU descarboxilasa. Esta última enzima catalizaría la descarboxilación del OHCU para producir S-alantoína. Sorprendentemente, la HIU hidrolasa identificada en ratón no está filogenéticamente relacionada con la HIU hidrolasa identificada en nódulos de soja. Sin embargo, tanto en el genoma de *Arabidopsis* como de otras plantas, incluida la soja, se identificaron genes ortólogos de la HIU hidrolasa y de la OHCU descarboxilasa identificadas en ratón, aunque en estas plantas ambas actividades enzimáticas se encuentran localizadas en un mismo polipéptido bifuncional. Recientemente, diferentes grupos han demostrado la funcionalidad de ambos dominios de esta proteína en *Arabidopsis*, a la que han denominado alantoína sintasa (Pessoa *et al.*, 2010; Lamberto *et al.*, 2010). Resultados recientes indican que en soja hay al menos dos enzimas que catalizan la hidrólisis del HIU, una específica de nódulos, posiblemente involucrada en las síntesis de los ureidos provenientes de la FBN, y otra que representa el dominio HIU hidrolasa de la alantoína sintasa. Se desconoce si en soja el OHCU se degrada en nódulos por otra enzima con esta actividad o por el dominio OHCU

de la enzima alantoína sintasa. En soja, la alantoína sintasa se ha encontrado tanto en el citosol como en el peroxisoma (Hennebry *et al.*, 2006; Lamberto *et al.*, 2010).

6. Catabolismo de los ureidos

6.1 Catabolismo de la alantoína

En plantas, animales y en gran número de microorganismos, el último paso para la síntesis de los ureidos, y a la vez el primero de su catabolismo, está catalizado por la enzima alantoína amidohidrolasa (alantoinasa, EC 3.5.2.5) (Vogels *et al.*, 1966; Kim *et al.*, 2009) (Figura 1). Esta enzima cataliza la hidrólisis de la S-alantoína a alantoato (Schubert y Boland, 1990).

Sin embargo, existen microorganismos que carecen de secuencias ortólogas al gen de la alantoinasa (DAL 3), como por ejemplo *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* o *Schizosaccharomyces pombe*. En estos organismos, Ramazzina y col. (2008) identificaron una proteína perteneciente a la familia de las polisacárido desacetilasas, a la que denominaron puuE, que llevaría a cabo la degradación de la S-alantoína a alantoato, siguiendo una ruta diferente a la de la mayoría de los organismos, que poseen la enzima alantoinasa.

En plantas, la enzima alantoinasa ha sido purificada hasta homogeneidad a partir de cotiledones y nódulos de soja (Webb y Lindell, 1993; Bell y Webb, 1995), así como a partir de frutos de judía (Raso *et al.*, 2007b). En judía, Raso y col. (2007b) encontraron dos proteínas con actividad alantoinasa, con características muy similares entre sí pero con una distribución diferente en los tejidos de la planta. Anteriormente, Bell y Webb (1995) habían descrito múltiples formas de esta actividad en nódulos y cotiledones de soja. Más tarde, Yang y Han (2004) identificaron el ADNc de esta enzima en *Arabidopsis* y *Robinia pseudoacacia* y demostraron su función mediante complementación en levaduras que carecían de actividad alantoinasa. Además, estos autores comprobaron que los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la enzima alantoinasa eran incapaces

de crecer usando la alantoína como única fuente de nitrógeno. Más recientemente, en soja, se han identificado 4 genes que codificarían la enzima alantoinasa, mientras que en judía se han encontrado 2 genes que codificarían esta enzima (Díaz-Leal *et al.*, 2012; Duran y Todd, 2012). No obstante, aún no hay evidencias experimentales que indiquen que las diversas formas de la enzima alantoinasa encontradas en soja y judía sean el resultado de la expresión de genes distintos. En plantas, la enzima alantoinasa se ha localizado en el retículo endoplásmico (Hanks *et al.*, 1981; Werner *et al.*, 2008), aunque aún no está claro cómo se transporta la alantoína desde el peroxisoma al retículo para su degradación vía alantoinasa. A diferencia de las alantoinasas descritas en plantas (Vogels y van der Drift, 1966; Raso *et al.*, 2007b), la enzima alantoinasa identificada en *E. coli* mostró una mayor activación por zinc y por cobre que por manganeso (Cusa *et al.*, 1999), que se supone que es el cofactor de la enzima de plantas.

6.2 Catabolismo del alantoato

Para la completa reutilización del N y C de los ureidos es necesario que el alantoato sea degradado hasta glioxilato y amonio. Al comenzar este trabajo de tesis no se había esclarecido la cuestión de si la degradación del alantoato en plantas se llevaba a cabo con producción directa de amonio (vía alantoato amidohidrolasa, ureidoglicina aminohidrolasa y ureidoglicolato amidohidrolasa) o usando urea como intermediario (vía alantoica y/o ureidoglicolato urea-liasa), que son las dos vías alternativas encontradas en microorganismos (Revisado por Todd *et al.*, 2006; Werner y Witte, 2011). Las principales causas de esta controversia eran que en ese momento aún no se habían purificado la mayor parte de las enzimas involucradas, así como la existencia de datos contradictorios procedentes de experimentos fisiológicos llevados a cabo con inhibidores. No obstante, la identificación posterior de muchas de esas enzimas (Todd y Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008; Serventi *et al.*, 2010; Werner *et al.*, 2010; Muñoz *et*

al., 2011) indicaría que la vía predominante debe ser con producción directa de amonio.

Como se ha mencionado antes, la degradación del alantoato puede estar catalizada por dos enzimas diferentes: la alantoato amidohidrolasa (AAH, EC 3.5.3.9) y la alantoato amidinohidrolasa (alantoicasa, EC 3.5.3.4) (Vogels y van der Drift, 1976). La actividad alantoicasa cataliza la degradación del alantoato a ureidoglicolato y urea, así como del ureidoglicolato a glioxilato y urea (Schubert, 1986). Esta enzima se ha encontrado en algunos hongos, así como en bacterias y animales, entre ellos el hombre (Lawther *et al.*, 1974; Yoo y Cooper, 1991; Vigetti *et al.*, 2000; 2001; Masuda *et al.*, 2001). Además, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se comprobó que mutantes deficientes en esta enzima eran incapaces de crecer usando alantoína o alantoato como única fuente de nitrógeno (Lawther *et al.*, 1974). Hasta el momento, el único organismo fotosintético donde se ha encontrado la actividad alantoicasa es el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Piedras *et al.*, 2000).

La actividad alantoato amidohidrolasa cataliza la degradación del alantoato a S-ureidoglicina con producción de amonio y CO₂. Esta enzima se ha encontrado en algunas bacterias (Xu *et al.*, 1995b; Cusa *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2001) y más recientemente se ha comprobado su existencia también en plantas (Todd y Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008).

Shelp y Ireland (1985) estudiaron la degradación completa de la alantoína en secciones de hojas de soja. Estos autores describieron que en presencia de acetohidroxamato, usado como inhibidor de la ureasa, no se producía amonio ni CO₂ a partir de alantoato, y sugirieron que este paso enzimático estaría catalizado por la enzima alantoicasa. No obstante, otros autores observaron en semillas y hojas de soja una actividad degradadora de alantoato que producía amonio y CO₂ y que, por tanto, debía ser una AAH (Winkler *et al.*, 1985; 1987). Sin embargo, Subhash y col. (1989) observaron que el acetohidroxamato es también un inhibidor de las enzimas alantoinasa y AAH, lo que daría una explicación a los

resultados anteriores aparentemente contradictorios. Asimismo, Lukaszewski y col. (1992) describieron una actividad degradadora de alantoato en hojas de soja cuyas características coincidían con las descritas por Winkler y col. (1985) para una AAH. Dados los resultados antes descritos, Todd y Polacco (2004) analizaron la degradación del alantoato *in vitro* en hojas machacadas de soja, en presencia del inhibidor de la ureasa fenilfosfordiamidato (PPD) e *in vivo* con mutantes de soja deficientes de ureasa. Los resultados obtenidos por estos autores indicaban que en la degradación del alantoato se producía tanto amonio como urea, sugiriendo que la degradación del alantoato estaría catalizada por una alantoato amidohidrolasa (que produce amonio), mientras que la degradación del ureidoglicolato lo estaría por una ureidoglicolato urea-liasa similar a la purificada en garbanzo por Muñoz y col. (2001). No obstante, más recientemente se ha comprobado que las ureidoglicolato urea-liasas identificadas en plantas (Muñoz *et al.*, 2001; 2006), que se creía que producían glioxilato y urea, en realidad llevan a cabo una reacción diferente a partir del ureidoglicolato (Muñoz *et al.*, 2011).

La primera secuencia de una AAH de plantas fue identificada por Todd y Polacco (2006) en *Arabidopsis*. Por otra parte, Raso y col. (2007a) purificaron parcialmente una actividad catalizadora de la degradación del alantoato (PH-alcasa) a partir de frutos de judía. Esta actividad enzimática se diferencia tanto de la AAH como de la alantoicasa, ya que en su reacción no se producen las cantidades esperadas de urea ni de amonio a partir del alantoato, aunque sí ureidoglicolato. Además, estos autores describieron que para determinar esta actividad enzimática era necesario incluir fenilhidrazina en la reacción, de forma similar a como ocurre con las actividades inicialmente identificadas como ureidoglicolato urea-liasas purificadas en garbanzo y judía (Muñoz *et al.*, 2001; 2006). Una vez comenzado este trabajo de tesis, Werner y col. (2008) purificaron hasta homogeneidad electroforética las primeras AAHs de plantas, tras su sobreexpresión como proteínas recombinantes en *Nicotiana benthamiana*.

Además, estos autores comprobaron que mutantes de *Arabidopsis* deficientes en esta enzima, incapaces de crecer usando alantoína o alantoato como única fuente de nitrógeno, sí crecían cuando se complementaban con la AAH sobre-expresada, confirmando los resultados obtenidos previamente por Todd y Polacco (2006). Como se ha mencionado, la enzima AAH cataliza la degradación del alantoato a S-ureidoglicina, CO₂ y amonio. Aunque ya Vogels y van der Drift (1976) sugirieron que la S-ureidoglicina era el producto de esta reacción, la inestabilidad de este compuesto ha propiciado que la formación de S-ureidoglicina no se haya demostrado hasta muy recientemente (Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010). Tanto la AAH de *Arabidopsis* como la AAH de soja se han encontrado en el retículo endoplásmico, localización que comparten con la enzima alantoinasa (Werner *et al.*, 2008). Las AAHs identificadas en plantas se activan en respuesta a la adición de manganeso (Werner *et al.*, 2008), como ocurre con las AAHs de varios microorganismos (Vogels y van der Drift, 1976). La cristalización de la AAH de *E. coli* reveló que esta enzima es un homodímero con dos sitios activos situados en la zona de contacto entre las dos subunidades y que cada uno de los sitios activos contiene un anión sulfato o fosfato y un catión divalente, que en *E. coli* probablemente sea el zinc (Agarwal *et al.*, 2007).

6.3 Catabolismo de la ureidoglicina

Como ya se ha mencionado, el producto de la enzima AAH, la S-ureidoglicina, es inestable y se descompone rápidamente *in vitro* a glioxilato, urea y amonio (van der Drift *et al.*, 1970; Winkler *et al.*, 1985; Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010). No obstante, se ha podido determinar la presencia de S-ureidoglicolato (Gravenmade *et al.*, 1970; Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010), lo que indica que la S-ureidoglicina *in vivo* es hidrolizada enzimáticamente. Recientemente, se ha identificado el gen que codifica la enzima ureidoglicina aminohidrolasa (UGlyAH, EC 3.5.3.-) en *Arabidopsis* y en *E. coli*. Estas proteínas se han purificado y caracterizado bioquímicamente y se ha demostrado

que la enzima UGlyAH cataliza al hidrólisis de S-ureidoglicina a S-ureidoglicolato y amonio (Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2012). Además, Serventi y col. (2010) observaron que la UGlyAH de *Arabidopsis* se activa por manganeso y que se localiza en el retículo endoplásmico, al igual que las enzimas alantoinasa y AAH que catalizan los pasos previos.

6.4 Catabolismo del ureidoglicolato

En leguminosas, Winkler y col. (1988) describieron una actividad ureidoglicolato amidohidrolasa y propusieron que esta enzima podría formar parte de un complejo enzimático junto con la enzima AAH. Más tarde, Muñoz y col. (2001; 2006), a partir de frutos de garbanzo y de judía, purificaron hasta homogeneidad electroforética dos enzimas dependientes de fenilhidrazina, inicialmente consideradas ureidoglicolato urea-liasas. No obstante, recientemente ha quedado claro que estas enzimas no catalizan la degradación del ureidoglicolato a glioxilato y urea directamente, sino que usan la fenilhidrazina junto con el ureidoglicolato para formar ureidoglicolil-fenilhidrazida, que es inestable y se descompone a glioxilato y urea, explicando así su identificación inicial como urea-liasas (Muñoz *et al.*, 2011).

El producto de la UGlyAH, el S-ureidoglicolato, se descompone espontáneamente *in vitro* dando glioxilato y urea (Gravenmade *et al.*, 1970). Esta reacción espontánea requiere varias horas y es, por tanto, demasiado lenta para ser la reacción que tiene lugar *in vivo*. Recientemente, en *Arabidopsis* se ha identificado el gen que codifica la enzima ureidoglicolato amidohidrolasa (UAH, EC 3.5.3.19). Curiosamente de este gen sólo se han encontrado ortólogos dentro del reino vegetal. La enzima UAH cataliza la hidrólisis del S-ureidoglicolato a glioxilato, CO₂ y dos moléculas de amonio, probablemente actuando como intermediarios el carbamato y la hidroxiglicina (Werner *et al.*, 2010). Esta enzima

se ha localizado también en el retículo endoplásmico y, al igual que la AAH y la UGlyAH, se activa por manganeso (Werner *et al.*, 2010).

En algunas bacterias que carecen de la enzima UGlyAH, además de las enzimas anteriormente descritas, se ha encontrado también una ruta enzimática alternativa. Esta ruta permite la conversión de la S-ureidoglicina a oxalurato y glicina, en una reacción catalizada por la enzima S-ureidoglicina-glioxilato aminotransferasa (French y Ealick, 2010; Ramazzina *et al.*, 2010). En bacterias, el S-ureidoglicolato también puede ser oxidado a oxalurato por la ureidoglicolato deshidrogenasa o hidrolizado a urea y glioxilato por la ureidoglicolato urea-liasa (Cusa *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 2010).

7. Papel de los ureidos en condiciones de estrés

Además de su papel como compuestos de transporte de nitrógeno, en los últimos años se ha relacionado a los ureidos con la inhibición de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) que ocurre en leguminosas ureídicas en condiciones de estrés hídrico (Serraj *et al.*, 1999b; King y Purcell, 2005; Ladrera *et al.*, 2007). Contrariamente a su papel inhibitorio del proceso de la FBN, varios trabajos han sugerido que los ureidos podrían proteger frente a los daños producidos por las especies reactivas de oxígeno (ROS) en diversas situaciones de estrés (Nakagawa *et al.*, 2007; Brychkova *et al.*, 2008).

Si bien la disponibilidad de agua y de nitrógeno determinan la productividad de la planta, la FBN es uno de los procesos que primero y más se ve afectado por la sequía (Serraj *et al.*, 1999b; Purcell *et al.*, 2004). Asimismo, se ha observado que la fijación de nitrógeno es más sensible al estrés hídrico en las leguminosas ureídicas que en las amídicas (Sinclair y Serraj, 1995; Serraj *et al.*, 1999a). Diferentes autores han sugerido que la sensibilidad al estrés hídrico en soja está relacionada con la acumulación de ureidos, principalmente alantoato, en las partes aéreas de la planta a través de un posible mecanismo de inhibición por producto (Serraj *et al.*, 1999b; King y Purcell, 2005). Por otra parte, se ha

comprobado que existe una correlación entre los niveles de ureidos y la inhibición de la fijación del nitrógeno en cultivares sensibles y tolerantes de soja (King y Purcell, 2005; Ladrera *et al.*, 2007). No obstante, según Ladrera y col. (2007) la acumulación de ureidos en los primeros momentos de estrés hídrico ocurre en los nódulos y no en las hojas. Estos resultados están de acuerdo con la correlación entre la inhibición de la FBN y la acumulación de compuestos nitrogenados en los nódulos de guisante, observada por Marino y col. (2007). Por el contrario, Charlson y col. (2009), de acuerdo con los resultados obtenidos en soja por otros autores (Serraj *et al.*, 1999b; King y Purcell, 2005), observaron una gran acumulación de ureidos en hojas y tallos de cultivares sensibles y tolerantes de soja que sufrían sequía.

La existencia de variedades de soja con diferente sensibilidad de la FBN frente a la sequía se ha relacionado con la ruta de degradación del alantoato utilizada por la planta. Varios trabajos han sugerido una mayor sensibilidad en las variedades que utilizan la vía productora de amonio (AAH) que en aquellas que utilizan la vía productora de urea (alantoicasa) (Vadez *et al.*, 2000; Vadez y Sinclair, 2000; 2001). De acuerdo con esta hipótesis, una deficiencia de manganeso, esencial para la actividad de la enzima AAH, podría ser la causa de la sensibilidad de la FBN a la sequía en algunas variedades de soja (Purcell *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2003). No obstante, esta hipótesis aún no ha sido confirmada, y algunos autores la consideran improbable (Todd *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2008). En el trabajo de Charlson y col. (2009) se observó que la expresión de la AAH en hojas era similar en las plantas regadas y en las sometidas a déficit hídrico y propusieron que la regulación post-transcripcional de esta enzima explicaría el incremento de ureidos observado en las hojas de las plantas sometidas a sequía.

Recientemente, varios trabajos han sugerido que los ureidos podrían tener un papel protector. Brychkova y col. (2008) observaron que en hojas de plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés por oscuridad, así como durante la senescencia

natural de las hojas, se producía un incremento en los niveles de ureidos, así como en la expresión de algunos de los genes implicados en el metabolismo de los mismos. Estos autores también observaron que plantas de *Arabidopsis* deficientes en la actividad xantina deshidrogenasa (XDH) eran más sensibles a estrés abiótico y acumulaban una mayor cantidad de H₂O₂. Sorprendentemente, la hipersensibilidad de las plantas deficientes en la enzima XDH se revertía al añadir alantoína o alantoato a la planta. Watanabe y col. (2010) obtuvieron resultados similares al estudiar el efecto del estrés hídrico en plantas de *Arabidopsis* deficientes en la enzima XDH. Estos autores observaron que las plantas transgénicas de *Arabidopsis* en las que se había bloqueado la expresión de la enzima XDH eran más sensibles al estrés hídrico, acumulaban una mayor cantidad de H₂O₂ y que esta hipersensibilidad se revertía al añadir urato a las plantas. Estos resultados han hecho que varios autores sugieran que los ureidos podrían actuar secuestrando los ROS, protegiendo de este modo los tejidos frente al daño producido por las especies reactivas de oxígeno (Brychkova *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2010). De acuerdo con esta hipótesis, los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la enzima XDH muestran una senescencia prematura, así como una reducción de su fertilidad, fenotipos que se revierten tras añadir urato a la planta (Nakagawa *et al.*, 2007; Brychkova *et al.*, 2008). No obstante, aún no está claro si el fenotipo observado en los mutantes de la enzima XDH de *Arabidopsis* es consecuencia de la interrupción del catabolismo de las purinas, ya que los mutantes de las enzimas alantoinasa y AAH no muestran un fenotipo tan claro (Yang y Han, 2004; Todd y Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008).

8. Justificación del trabajo que se presenta

Durante los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de los genes y las enzimas involucradas tanto en la síntesis como en la degradación de los ureidos en plantas. Esto se ha debido principalmente a la publicación de un gran número de genomas de plantas, así como al uso de métodos para la

purificación de proteínas en plantas de forma rápida y eficiente. No obstante, a pesar de la información obtenida en la planta modelo *Arabidopsis*, aún no se sabe si en otras plantas, como las leguminosas, existen rutas alternativas para el catabolismo de las purinas, como ocurre en microorganismos. Además, la información de que se dispone acerca de la regulación de las enzimas y genes involucrados en el metabolismo de ureidos es aún muy escasa, especialmente en leguminosas ureídicas donde los ureidos juegan un papel más importante.

En este trabajo se ha estudiado a nivel molecular el metabolismo de los ureidos en judía, una planta típicamente ureídica. Se han estudiado tanto el contenido de ureidos y otros compuestos nitrogenados, como los niveles de expresión de los genes y enzimas responsables de la síntesis y degradación de los mismos a lo largo del desarrollo de la planta en diferentes condiciones nutricionales y de cultivo, así como en respuesta a algunas situaciones de estrés. Se ha hecho especial hincapié en la caracterización fisiológica de la enzima involucrada en la degradación del alantoato en judía.

II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido la caracterización molecular, bioquímica y funcional de la degradación del alantoato en plantas de judía. Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Identificar y clonar los genes implicados en la degradación de alantoato en judía.
2. Caracterizar la enzima o enzimas responsables de la degradación del alantoato en judía.
3. Analizar el efecto de factores endógenos, como el desarrollo, y exógenos, como las condiciones de cultivo, sobre metabolismo del alantoato.
4. Estudiar la respuesta del metabolismo de los ureidos a diferentes condiciones de estrés.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

1.1. Productos químicos, kits y enzimas comerciales

Los diferentes kits y enzimas usados en este trabajo fueron suministrados por las casas comerciales que se indican entre paréntesis en cada caso y, salvo que se especifique otra cosa, se usaron siguiendo las indicaciones del fabricante. Los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos con el máximo grado de pureza. La conservación y manipulación se realizó siguiendo las indicaciones de los diversos fabricantes.

1.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Invitrogen o bien fueron suministrados junto con los kits comerciales *SMART RACE* (Clontech), *DIG DNA Labeling and Detection* (Roche), *GenomeWalker* (Clontech) y *iScript cDNA Synthesis* (Bio-rad).

2. Material biológico y condiciones de cultivo

2.1. Material vegetal

Para los experimentos con plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) se usaron semillas de la variedad Great Northern cv. Matterhorn (PMB-0220), suministradas por el Prof. Antonio de Ron (Misión Biológica de Galicia, C.S.I.C., Pontevedra). Para la expresión de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep se usaron plantas de *Nicotiana benthamiana*.

2.1.1. Condiciones de cultivo habituales y recogida de muestras

De forma rutinaria, las semillas de *P. vulgaris* se esterilizaron mediante lavados con etanol (30 segundos), hipoclorito sódico al 0,2% (v/v) (5 min) y, finalmente, seis lavados con agua destilada estéril. Tras la esterilización, las semillas se incubaron en placas de Petri durante 72 horas a 26 °C sobre papel de filtro húmedo. Una vez germinadas, se sembraron 4 - 5 semillas por maceta (16 cm de

diámetro por 18 cm de altura) en una mezcla de vermiculita y perlita (2/1, v/v). Las plantas se cultivaron en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 26 °C y 8 horas de oscuridad a 21 - 19 °C de temperatura, con una intensidad lumínica de 200 - 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una humedad relativa del 70%. Las plantas cultivadas en condiciones en fijación de nitrógeno (FBN; noduladas) fueron inoculadas con un cultivo líquido fresco (1 ml/planta) de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* ISP 14 en el momento de la siembra y reinoculadas 7 días después de la misma. Estas plantas se regaron 3 veces por semana con medio de cultivo para plantas Harper y Gibson diluido $\frac{1}{4}$ sin fuente de nitrógeno, excepto en su primer riego en el que el medio contenía KNO_3 5 mM. Las plantas fertilizadas con nitrato no se inocularon y se regaron rutinariamente con medio de cultivo para plantas con KNO_3 10 mM como fuente de nitrógeno.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se cultivaron en sustrato vegetal (3 plantas por maceta), en cámara de cultivo bajo las condiciones de luz, temperatura y humedad antes descritas y se regaron 3 veces por semana con agua.

Rutinariamente, de las plantas de judía se recogieron y analizaron las siguientes muestras: 3ª y 4ª hoja trifoliada, tallo (parte basal, intermedia y superior), raíces (sin los nódulos) y nódulos. Las muestras de xilema de plantas de judía, noduladas o fertilizadas con nitrato, se recogieron siguiendo las indicaciones de McClure y Israel (1979). Para ello, con una cuchilla estéril se cortó el tallo de la planta, justo por debajo del nudo donde se encuentran los cotiledones. A continuación, la superficie del corte se lavó con agua desionizada y se recogió el xilema de cada planta durante 20 min. Todas las muestras de xilema se recogieron entre las 11:00 y las 12:00 de la mañana. De las plantas de *N. benthamiana* se recogieron tres hojas expandidas por planta, siempre de plantas jóvenes (3 - 4 semanas). Todo el material vegetal utilizado se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Medio de cultivo para plantas Harper y Gibson: la solución nutritiva de Harper y Gibson diluida $\frac{1}{4}$ estaba 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), 0,02 g/l. Ajustar pH a 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.

2.1.2. Experimentos fisiológicos

Se utilizaron plantas de judía cultivadas en las condiciones descritas en el apartado anterior y como se indicará en cada caso.

2.1.2.1. Tratamientos con alopurinol

Los tratamientos con alopurinol se llevaron a cabo en plantas noduladas de judía, cultivadas en las condiciones habituales. A los 26 días tras su siembra (DPS), estas plantas se dividieron en dos grupos. Uno de los grupos de plantas se regó cada 3 días con solución de Harper y Gibson diluida $\frac{1}{4}$, mientras que el otro grupo de plantas se regó cada 3 días con esta solución suplementada con alopurinol 0,1 mM durante 14 días. La solución de alopurinol se preparó justo antes de cada riego, en el que se usaron 200 ml por maceta. De estas plantas se recogieron muestras de la 3^a y 4^a hoja trifoliada antes (26 DPS) y después de comenzar el tratamiento con alopurinol (28, 30, 32, 34, 35, 37, 39 y 42 DPS). La recogida de muestras se realizó entre las 11:00 y las 12:00 a.m.

2.1.2.2. Experimentos en condiciones de oscuridad total o parcial

Para los experimentos en condiciones de oscuridad total se usaron plantas de judía cultivadas en condiciones de FBN. A los 28 DPS, estas plantas se dividieron en 2 grupos equivalentes. Uno de los grupos se mantuvo en las condiciones de iluminación habituales (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad; plantas control), mientras que el otro grupo se trasladó durante 48 h a una cámara de cultivo con las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa pero

sin luz. Trascurrido este tiempo, las plantas mantenidas en oscuridad se transfirieron durante 24 horas a condiciones de iluminación normales. Tanto de las plantas control como de las plantas mantenidas en oscuridad se recogieron muestras de la 3ª y 4ª hoja trifoliada y de tallos, antes (0) y después (24 y 48 horas de oscuridad) del tratamiento de oscuridad, así como transcurridas 24 horas tras devolver las plantas que habían estado 48 horas en oscuridad a las condiciones de luz estándar.

Para los experimentos en condiciones de oscuridad parcial, las plantas noduladas de judía de 28 DPS se dividieron en 2 grupos equivalentes. Uno de los grupos de plantas se mantuvo en condiciones de luz estándar (plantas control), mientras que al otro grupo se les cubrió el 50% de las hojas trifoliadas con papel de aluminio (plantas tratadas). Transcurridas 48 horas en estas condiciones, se recogieron muestras de las hojas cubiertas con aluminio, de las hojas no cubiertas y de los tallos de las plantas tratadas, así como de las hojas trifoliadas y tallos de las plantas control.

2.1.2.3. Experimentos en condiciones de déficit hídrico

Para los experimentos de estrés por déficit hídrico se utilizaron plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno. A los 28 DPS, las plantas se dividieron en 2 grupos equivalentes. Uno de los grupos de plantas se mantuvo con irrigación normal (plantas control), mientras que el otro dejó de regarse durante 10 días (plantas tratadas). De estas plantas se recogieron muestras de nódulos, raíces, tallo y de la 3ª y 4ª hoja trifoliada, antes (28 DPS) y después del tratamiento de déficit hídrico (38 DPS).

2.1.2.4. Tratamientos con hormonas

Para los tratamientos con hormonas se usaron plantas noduladas de judía. A los 19 DPS, estas plantas se dividieron en 4 grupos equivalentes. Uno de los grupos de plantas se regó cada 24 h con agua (plantas control), mientras que cada uno de

los 3 grupos restantes se trató por separado con las hormonas ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA). Para ello, se preparó una solución concentrada de cada una de las hormonas (ABA y JA disueltos en etanol y SA en agua) que, posteriormente, se diluyó hasta una concentración final de 10 μM el ABA, 50 μM el JA y 200 μM el SA. En los casos en los que fue necesario, se ajustó el pH a 6,8. Cada uno de estos grupos de plantas se trató cada 24 h con 200 ml de las anteriores soluciones de hormonas, mediante su aplicación en el riego y pulverización sobre las hojas. Dos días después de comenzar el tratamiento, se recogieron muestras de la 3ª y 4ª hoja trifoliada de las plantas tratadas con cada una de las hormonas vegetales y de las plantas control.

2.1.2.5. Experimentos con alta y baja temperatura

Para los tratamientos de alta y baja temperatura se usaron hojas trifoliadas cortadas procedentes de plantas noduladas de judía de 21 DPS. Para el tratamiento con alta temperatura, las hojas se incubaron durante 2 horas a 39 °C en placas de Petri de 14 cm de diámetro, sobre papel de filtro humedecido para evitar la desecación de las muestras. En el tratamiento con baja temperatura, las hojas se incubaron durante 4 horas a 4 °C, en placas de Petri de 14 cm de diámetro sobre papel de filtro humedecido. Como control de los tratamientos se usaron hojas trifoliadas cortadas de plantas noduladas de judía de la misma edad y mantenidas a temperatura ambiente en placas de Petri de 14 cm de diámetro sobre papel de filtro humedecido durante 2 y 4 horas, respectivamente.

2.2. Cepas bacterianas

En la tabla 1 se indica la especie, cepa, resistencia a antibióticos y el origen o la referencia de cada una de las estirpes bacterianas usadas en este trabajo.

La cepa DH5 α de *Escherichia coli* es una estirpe deficiente en diferentes endonucleasas intracelulares y en algunos de los componentes del sistema de restricción-modificación de bacterias. Además, el genotipo *lacZ* Δ M15 de esta

cepa la hace compatible con la selección blanco/azul que poseen algunos vectores de clonación, como el vector *pGEMT-Easy*. En este tipo de vectores, la inserción de un fragmento de ADN exógeno da lugar a la interrupción del gen de la β -galactosidasa, impidiendo así la síntesis correcta de la enzima que hidroliza el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), cuyo producto de degradación da un color azul a la colonia. De este modo, aquellas bacterias que contienen el vector con un fragmento de ADN clonado en él son blancas, mientras que las que han sido transformadas con el plásmido vacío tienen color azul.

Tabla 1. Cepas bacterianas. En la tabla se indica la especie, cepa, resistencia a antibióticos y el origen o referencia de cada una de las estirpes bacterianas usadas en este trabajo.

<i>Especie</i>	<i>Cepa</i>	<i>Resistencia a antibióticos</i>	<i>Origen o referencia</i>
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	-	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	-	Novagen
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	ISP 14	-	Dra. Dulcenombre Rodríguez
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58C1:: pCH32	Rifampicina, tetraciclina	Prof. Juan Antonio García
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101: :pMP90RK	Rifampicina, kanamicina y gentamicina	(Koncz y Schell, 1986)
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	k599	Rifampicina	Prof. Federico Sánchez

La cepa BL21 (BE3) de *E. coli* es una estirpe deficiente en varias proteasas celulares y que incorpora en su genoma el gen de la ARN polimerasa T7, bajo el control de un promotor inducible por IPTG. Estas características la convierten en una cepa idónea para la expresión heteróloga de proteínas en *E.*

coli. Las cepas DH5 α y BL21 de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37 °C durante 12 - 16 h.

La cepa ISP 14 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* es una estirpe de *Rhizobium* con la capacidad de formar nódulos en las raíces de diferentes especies del género *Phaseolus*. Esta cepa se usó para inocular las plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación biológica de nitrógeno. Esta cepa se cultivó en medio de *Rhizobium* durante 48 h a 28 °C.

La cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*, transformada con el plásmido *helper* pCH32, se usó para la transformación de hojas de *Nicotiana benthamiana*. Esta estirpe se cultivó durante 24 h a 28 °C en medio LB suplementado con rifampicina (100 μ g/ml) y tetraciclina (15 μ g/ml). La cepa GV3101::pMP90RK de *A. tumefaciens* también se usó para la transformación de hojas de *N. benthamiana*. Esta cepa es compatible con el vector *pAMPAT-MCS* (AY436765) y sus derivados como el *pXCSHASTrep*, usado en este trabajo. La cepa GV3101::pMP90RK de *Agrobacterium* se cultivó en medio LB a 28 °C durante 48 h en medio sólido y durante 16 - 20 h en medio líquido con selección por rifampicina (100 μ g/ml), kanamicina (50 μ g/ml) y gentamicina (15 μ g/ml).

La cepa k599 de *Agrobacterium rhizogenes* posee la capacidad de infectar y transformar raíces de diferentes especies vegetales, entre ellas varias del género *Phaseolus*. Tras la infección se produce la formación de raíces transformadas, denominadas raíces pilosas. La cepa k599 de *Agrobacterium* se cultivó en medio LB durante 24 h a 28 °C con selección por rifampicina (100 μ g/ml).

El cultivo en medio líquido se realizó en agitación a 200 rpm en un agitador orbital termostatzado y en matraces de crecimiento con una cámara de aire de aproximadamente 4/5 partes del volumen total, a la temperatura y durante el tiempo indicado para cada cepa bacteriana.

Para su conservación, las estirpes bacterianas se congelaron en nitrógeno líquido en el mismo medio nutritivo utilizado para su crecimiento suplementado

con glicerol estéril al 20% (v/v). Tras la congelación en presencia de glicerol las cepas se almacenaron a -80°C .

Medios de cultivo para bacterias: los medios de cultivo para bacterias se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 126°C . Para preparar medio de cultivo sólido, se añadió agar al 1,5% (p/v).

Medio LB (Luria-Bertani): NaCl, 10 g/l; bacto-triptona, 10 g/l; y extracto de levadura, 5 g/l.

Medio para *Rhizobium*: K_2HPO_4 , 0,4 g/l; KH_2PO_4 , 0,1 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l; NaCl, 0,1 g/l; Cl_2Ca , 0,04 g/l; extracto de levadura, 0,8 g/l; y manitol, 10 g/l. Ajustar pH a 7,2 con HCl.

3. Preparación de células competentes

Todo el material usado para la preparación de células competentes, a menos que se indique lo contrario, fue esterilizado en autoclave a 126°C durante 20 min.

3.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

Para la preparación de células competentes de las cepas DH5 α y BL21 de *E. coli* se siguió el método descrito por Inoue y col. (1990). Para ello, a partir de una colonia bacteriana procedente de un cultivo sólido fresco, se inoculó un cultivo de 3 ml de medio LB líquido. Tras 8 h a 37°C en agitación, con este cultivo se inocularon 250 ml de medio SOB líquido. Se incubó a 18°C en agitación hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,5 (aproximadamente 30 h). Una vez alcanzada esta densidad óptica, las células se concentraron mediante centrifugación a 1.100 g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y las células precipitadas se resuspendieron en 80 ml de tampón TB frío. Tras 10 min en hielo, la suspensión se centrifugó a 1.100 g durante 10 min a 4°C . A continuación, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 ml de tampón TB frío con DMSO al 7%. Después de 10 min en hielo, las células se dividieron en partes alícuotas, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Medio SOB: Bacto-triptona, 20 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM.

Tampón TB: Pipes 10 mM; KCl 250 mM y CaCl₂ 15 mM. Ajustar pH a 6,7 con KOH y añadir 55 ml de MnCl₂ 1 M (Cf 55 mM). Esterilizar por filtración (filtro de 0,22 µm) y conservar a 4 °C.

3.2. Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium*

El protocolo que a continuación se describe se usó para la preparación de células electrocompetentes de las diferentes cepas de *Agrobacterium*. A partir de una colonia bacteriana, procedente de un cultivo fresco, se inocularon 100 ml de medio LB líquido con los antibióticos adecuados. Este cultivo se incubó a 28 °C en agitación hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de aproximadamente 0,5 – 0,6. A continuación, el cultivo se centrifugó a 1.100 g durante 10 min a 4 °C, y las células precipitadas se lavaron sucesivamente con 100, 50, 20 y 20 ml de una solución fría (0 - 2 °C) de glicerol al 10%. Una vez finalizados los lavados, la suspensión celular se centrifugó a 1.100 g durante 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células precipitadas se resuspendieron en 2 ml de una solución fría de glicerol al 10%. Por último, las células se dividieron en partes alícuotas, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

4. Vectores

En la tabla 2 se enumeran los vectores usados en este trabajo, la resistencia a antibióticos que confieren y su origen o referencia.

pGEMT-Easy se usó para la clonación de diversos fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR. Este plásmido confiere resistencia a ampicilina y permite la clonación directa de productos de PCR terminados en su extremo 3' en un residuo de desoxiadenosina. Además, como se explica en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos, este vector permite seleccionar a simple vista aquellas bacterias que contienen el vector con un fragmento de ADN clonado en él (colonias blancas) de las que han sido transformadas con el vector vacío (colonias

azules). La cepa DH5 α de *E. coli* se transformó con las diferentes construcciones obtenidas usando este plásmido. Las células transformadas con estas construcciones se seleccionaron mediante la adición al medio de cultivo de ampicilina (100 μ g/ml), IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido; 0,3 mM) y X-gal (0,02 mg/ml).

Tabla 2. Vectores. En la tabla se indican los diferentes vectores usados en este trabajo, la resistencia a antibióticos que confieren y su origen o referencia.

<i>Vector</i>	<i>Uso</i>	<i>Resistencia a antibióticos</i>	<i>Origen o referencia</i>
<i>pGEMT-Easy</i>	Clonación	Ampicilina	Promega
<i>pET30b</i> ⁺	Expresión	Kanamicina	Novagen
<i>pBIN61:P19</i>	Expresión de la proteína P19	Kanamicina	(Voinnet <i>et al.</i> , 2003)
<i>pXCSHAStrep</i>	Expresión	Carbenicilina	(Witte <i>et al.</i> , 2004)
<i>pFGC5941</i>	Silenciamiento génico	Kanamicina	<i>Arabidopsis Biological Resource Center</i>

El vector comercial *pET30b*⁺ se usó para la sobreexpresión de la proteína recombinante His₆-PvAAH en *E. coli*. Este vector permite la sobreexpresión en bacterias de proteínas fusionadas a una cola de histidinas en el extremo N-terminal, C-terminal, o en ambos extremos. La cepa BL21 de *E. coli* se transformó con las diferentes construcciones generadas en este vector. La selección de las células transformadas con estas construcciones se hizo mediante la adición al medio de kanamicina (50 μ g/ml).

La construcción *pBIN61:P19* se usó para la expresión de la proteína P19, supresora del silenciamiento génico del virus del enanismo del tomate (Voinnet *et al.*, 2003), en *N. benthamiana*. Con esta construcción se transformó la cepa C58C1::pCH32 de *A. tumefaciens*. La selección de las bacterias transformadas

con esta construcción se hizo mediante la adición al medio de kanamicina (50 µg/ml), rifampicina (100 µg/ml) y tetraciclina (15 µg/ml).

El vector *pXCShAStrep*, derivado del plásmido *pAMPAT-MCS*, se usó para la expresión de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep en *N. benthamiana*. Este vector permite la expresión en plantas de proteínas fusionadas en la región C-terminal al epítipo HA-Strep. La cepa GV3101::pMP90RK de *Agrobacterium* se transformó con las diferentes construcciones basadas en este vector. La selección de las células transformadas con estas construcciones se hizo mediante la adición al medio de carbenicilina (75 µg/ml, para medio sólido y 50 µg/ml, para medio líquido), rifampicina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) y gentamicina (15 µg/ml).

El vector *pFGC5941* se usó para el silenciamiento génico de la expresión de la proteína PvAAH en judía. Este vector posee dos sitios de clonación múltiple flanqueando un intrón del gen de la chalcona sintasa A de petunia. Esta disposición permite la clonación de un mismo fragmento de ADN en sentido directo, en uno de los sitios de clonación múltiple, y en sentido reverso, en el otro, dando lugar así a la expresión de un ARN interferente (*RNAi*) de tipo horquilla (*hairpin RNA*). Con esta construcción se transformó la cepa k599 de *A. rhizogenes*. La selección de las bacterias transformadas con esta construcción se hizo mediante la adición al medio de cultivo de kanamicina (50 µg/ml) y rifampicina (100 µg/ml).

5. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

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

5.1. Aislamiento y purificación de ADN genómico

El ADN genómico se extrajo a partir de hojas jóvenes de plantas de judía recogidas a los 7 - 14 DPS. Estas muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron en un mortero de porcelana hasta conseguir un polvo fino, añadiendo nitrógeno líquido de forma continua para evitar que se descongelase durante el proceso. Para el aislamiento y purificación del ADN genómico se usó una modificación del método descrito por Doyle y Doyle (1987), así como el kit comercial *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep* (Sigma).

5.1.1. Método Doyle y Doyle (adaptado)

A 0,8 ml de tampón de extracción (previamente calentado a 60 °C) se añadieron 200 mg de tejido, se mezcló mediante agitación en vórtex y se incubó durante 40 min a 60 °C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 0,8 ml de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó durante 15 s y se centrifugó a 4.500 g durante 10 min a 4 °C. A continuación, se recogió la fase superior acuosa y se añadieron 0,48 ml de isopropanol, se agitó por inversión varias veces y se centrifugó a 4.500 g durante 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y sobre el precipitado se añadió 1 ml de una solución de etanol al 75% y 10 mM de acetato amónico. Tras mezclar por inversión, se centrifugó a 4.500 g durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 100 µl de tampón de elución con 10 µl de ARNasa A (5 U/µl; R4875, Sigma) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Tras el tratamiento con ARNasa, se añadieron 10 µl de acetato sódico 3 M y 100 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 5.500 g durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió sobre el precipitado 1 ml de etanol al 75% frío. Tras mezclar por inversión, se centrifugó a 4.500 g durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 30 µl de tampón de elución y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Tampón de extracción: CTAB al 2% (p/v); NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM (pH 8) y β -mercaptoetanol al 0,2% (v/v), añadido justo antes del uso.

Tampón de elución (TE): Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y EDTA 1 mM.

5.1.2. Kits comerciales para la extracción y purificación del ADN genómico

Para aislar ADN genómico de alta pureza se usó el kit comercial *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep* (Sigma).

5.2. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico

5.2.1. Lisis alcalina y precipitación con isopropanol

Rutinariamente, el ADN plasmídico aislado mediante este método se usó para el escrutinio de las cepas DH5 α y BL21 de *E. coli* transformadas con las diferentes construcciones usadas en este trabajo (Materiales y Método, apartado 10).

A partir de una colonia bacteriana se inocularon 3 ml de medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados. Tras 14 - 16 h en agitación a 37 °C, el cultivo se centrifugó a 1.100 g durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el sobrenadante y las células precipitadas se resuspendieron en 200 μ l de la solución I. Tras 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 400 μ l de la solución II, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para provocar la rotura de las células. Se añadieron 200 μ l de la solución III, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. A continuación, se centrifugó a 14.000 g durante 15 min a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se mezcló con 540 μ l de isopropanol y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para precipitar los ácidos nucleicos. Se centrifugó a 14.000 g durante 15 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Se añadió 1 ml de etanol al 75% sobre el precipitado y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 14.000 g durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 20 μ l de agua miliQ estéril con 2 μ l de ARNasa A (5 U/ μ l; R4875, Sigma) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Solución I: Glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM (pH 8) y EDTA 10 mM.

Solución II: NaOH 0,2 N y SDS al 1% (p:v). Preparar justo antes de usar.

Solución III: Acetato potásico 3 M y ácido acético glacial 5 M.

5.2.2. *Kits comerciales para la extracción y purificación de ADN plasmídico*

Para aislar el ADN plasmídico de las diferentes cepas de *Agrobacterium*, así como para obtener ADN plasmídico de alto grado de pureza procedente de *E. coli*, se utilizaron los kits comerciales *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), *FavorPrep Plasmid Extraction* (Favorgen) y *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). En cada caso se siguieron las indicaciones del fabricante.

5.3. *Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN*

Se utilizaron los kits comerciales que a continuación se enumeran: *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), *FavorPrep Gel/PCR Purification* (Favorgen), *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) y *QIAquick PCR Purification* (Qiagen). Estos kits permitieron purificar directamente productos de PCR, eliminando el resto de los componentes de la reacción de PCR, o bien fragmentos de ADN aislados tras su separación mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% (Materiales y Métodos, apartado 7.1).

5.4. *Aislamiento y purificación de ARN total*

El ARN total se extrajo a partir de muestras congeladas y pulverizadas con nitrógeno líquido. Para ello, a 100 mg de tejido congelado se le añadió 1 ml del reactivo comercial *TRI Reagent* (Sigma) o *TRISURE* (Bioline), se mezcló inmediatamente utilizando el agitador vórtex y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se agitó durante 15 s y se centrifugó a 14.000 g durante 15 min a 4 °C. Se recogió la fase superior acuosa a la que se le añadieron 0,5 ml de isopropanol, se mezcló por inversión y tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se centrifugó a

14.000 g durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, se añadió 1 ml de etanol al 75% sobre el precipitado y se centrifugó a 14.000 g durante 5 min a 4 °C. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. El precipitado se resuspendió en 200 µl de agua miliQ esterilizada en autoclave, se añadieron 133 µl de cloruro de litio 8 M, se mezcló por inversión y se incubó durante 12 h a 0 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 14.000 g durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 75%. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 14.000 g durante 5 min a 4 °C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado y, una vez seco, se resuspendió en 40 µl de agua miliQ estéril y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6. Cuantificación y análisis de pureza de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó espectrofotométricamente, midiendo su absorbancia (A) a 260 nm, teniendo en cuenta que los coeficientes de extinción para el ADN bicatenario y el ARN son de 50 y 40 µg⁻¹cm⁻¹ml, respectivamente. Al mismo tiempo, se determinó la absorbancia de las muestras a 230, 260 y 280 nm, para determinar la presencia de sales o proteínas contaminantes. Cocientes de $A_{260}/A_{230} < 2$ indican la presencia de contaminación de naturaleza glucídica, mientras que cocientes $A_{260}/A_{280} < 2$ indican la presencia de contaminación de naturaleza proteica. Para la cuantificación se empleó normalmente una dilución 1/500 en agua destilada estéril. Para la cuantificación del ADN y ARN también se usó un *NanoVue Plus* (GE Healthcare).

La integridad y pureza de los ácidos nucleicos se comprobó rutinariamente mediante electroforesis en gel de agarosa (Materiales y Métodos, apartados 7).

7. Fraccionamiento de ácidos nucleicos

7.1. Electroforesis de ADN

La separación electroforética del ADN se llevó a cabo empleando generalmente geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), en tampón TBE (0,5x). Las muestras de ADN se cargaron en el gel tras mezclarse con un volumen adecuado de tampón de carga de ADN (6x). La electroforesis se realizó a un voltaje comprendido entre 50 y 100 voltios (en función del tamaño de las moléculas de ADN y el contenido en agarosa del gel), durante un tiempo inversamente proporcional al voltaje empleado. En las electroforesis se incluyeron marcadores de peso molecular con objeto de estimar la cantidad de ADN presente y su tamaño; normalmente se trataba de 500 ng de ADN del fago λ digerido con las endonucleasas de restricción *HindIII* y *EcoRI* (Fermentas). La visualización de las moléculas de ADN se realizó tras la exposición del gel a luz ultravioleta (UV).

Tampón TBE (10x): Tris-HCl 90 mM (pH 8); H₃BO₃ 90 mM 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% (v/v).

7.2. Electroforesis de ARN

La separación electroforética del ARN se llevó a cabo empleando geles de agarosa al 1% en tampón TBE (0,5x) o MOPS (0,5x). Antes de la electroforesis, las muestras de ARN se mezclaron con un volumen adecuado de tampón de carga de ARN (3x) y se calentaron a 58 °C durante 5 min. La electroforesis se realizó a 50 voltios. El gel se visualizó con un transiluminador de luz UV.

Tampón MOPS (10x): MOPS 400 mM; acetato sódico 60 mM y EDTA 0,5 mM. Este tampón se preparó con H₂O miliQ, se ajustó a pH 7 con NaOH y se esterilizó en autoclave.

Solución de carga de ARN (3x): MOPS 1x; formaldehído al 23,3% (v/v); formamida desionizada al 66,7% (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).

8. Ligación de fragmentos de ADN

Todos los fragmentos de ADN usados en las reacciones de ligación fueron previamente purificados como se indica en el apartado 5.3 de Materiales y Métodos. La cantidad de inserto y vector usada en las ligaciones se calculó mediante la siguiente fórmula: $\mu\text{g de inserto} = 3 \times [(\text{pb de inserto} \times \mu\text{g de vector}) / (\text{pb de vector})]$.

Para las ligaciones en el vector comercial *pGEMT-Easy* se empleó la ligasa del fago T4 suministrada en el kit comercial *pGEMT-Easy Vector Systems* (Promega). Para las ligaciones en este vector se usaron fragmentos de ADN que provenían de reacciones de PCR con ADN polimerasas sin o con poca actividad correctora (*GoTaq DNA Polimerase* y *Advantage 2 Polymerase Mix*). Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a 16 °C durante toda la noche, en una mezcla compuesta por: 5 μl de tampón de ligación (2x); 0,5 μl (25 ng) de vector; 0,7 μl (2 unidades Weiss) de ADN ligasa T7, no más de 2 μl del fragmento de ADN y H₂O miliQ estéril hasta 10 μl .

Para las ligaciones en los vectores *pET30b⁺*, *pXCShAStrep* y *pFGC5941* se usó la ligasa del fago T4 suministrada por Promega. Estas reacciones de ligación se llevaron a cabo a 16 °C durante toda la noche, en una mezcla compuesta por: 1,5 μl de tampón de ligación (10x); 50 ng de vector; 1 μl (3 unidades Weiss) de ADN ligasa T7, no más de 3,5 μl del fragmento de ADN y H₂O miliQ estéril hasta 15 μl .

9. Transformación de células competentes

9.1. Transformación de células competentes de *E. coli*

Inmediatamente antes de la transformación, las partes alícuotas de células competentes necesarias, preparadas como se describe en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos, se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas, a 70 μl de suspensión de células competentes se añadieron 7 μl del producto de la ligación, se mezclaron por pipeteo y se incubó durante 15 min en hielo. A

continuación, esta mezcla se incubó durante 75 segundos a 42 °C y posteriormente en hielo durante 2 min. Se añadieron 0,9 ml de medio LB líquido, se mezcló por inversión y se incubó durante 1 h a 37 °C sin agitación. El cultivo obtenido se centrifugó a 1.100 g durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y las células precipitadas se resuspendieron en 100 µl de medio LB líquido. Finalmente, 50 µl de estas células transformadas se sembraron en medio LB sólido con los antibióticos adecuados y se incubaron a 37 °C durante 12 h.

9.2. Transformación de células electrocompetentes de *Agrobacterium*

En un tubo previamente enfriado en hielo se mezclaron 20 µl de células electrocompetentes (Materiales y Métodos, apartado 3.2) y entre 0,25 y 1 µg de ADN plasmídico de alta pureza (Materiales y Métodos, apartado 5.2.2). A continuación, la mezcla se pasó a una cubeta de electroporación de 0,1 cm de grosor *Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes* (Bio-rad), previamente enfriada en hielo, y se le aplicó un pulso eléctrico (2,5 V, 25 µF, con una resistencia entre 400 y 600 Ohms y durante 8 - 12 segundos) usando el sistema *MicroPulser Electroporator* (Bio-rad). Tras el pulso, las células se recogieron añadiendo 1 ml de medio LB líquido a la cubeta de electroporación, se transfirieron a un nuevo tubo y se incubaron a 28 °C durante 3 h. Trascurrido este tiempo, se sembraron en placas con medio LB sólido con los antibióticos apropiados y se incubaron a 28 °C durante 2 - 3 días.

10. Escrutinio de las colonias transformantes

Tras ser seleccionadas con los antibióticos adecuados, las colonias resultantes se analizaron para determinar la presencia o no del fragmento de ADN deseado. Para ello, se analizó el ADN plasmídico de estas colonias bacterianas mediante endonucleasas de restricción o por PCR. Además, en el caso de las bacterias transformadas con las construcciones en el vector *pGEMT-Easy*, la selección

blanco/azul permitió la identificación previa de aquellas colonias que contenían el vector con un fragmento de ADN clonado en él.

10.1. Análisis con endonucleasas de restricción

El ADN plasmídico, aislado como se indicó anteriormente (Materiales y Métodos, apartado 5.2.1), se digirió con las endonucleasas de restricción adecuadas para el análisis. A continuación, los diferentes fragmentos de ADN resultantes se separaron y analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Materiales y Métodos, apartado 7.1). En el caso del vector *pGEMT-Easy*, habitualmente se utilizó la enzima de restricción *EcoRI* (Fermentas), que liberaba el fragmento de ADN clonado en él. Para el análisis con endonucleasas de restricción de las construcciones en los vectores *pET30b⁺*, *pXCSHASTrep* y *pFGC5941* se usaron las mismas enzimas de restricción utilizadas para generarlas (Materiales y Métodos, apartado 20.1; 22.1 y 23.1, respectivamente), o bien otras adecuadas para identificar los clones positivos. Rutinariamente las digestiones se llevaron a cabo durante 1 h a la temperatura recomendada por el fabricante (habitualmente 37 °C), en una mezcla compuesta por: 2,5 µl de tampón (10x); 1 - 5 U de enzima de restricción; 1 µg de ADN plasmídico y H₂O miliQ estéril hasta 25 µl.

10.2. Análisis por PCR

El fragmento de ADN clonado en el sitio de clonación múltiple del vector se amplificó por PCR y el producto de esta PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. En estas reacciones se usó como molde tanto ADN plasmídico como directamente una pequeña porción de la colonia bacteriana. Como cebadores se usaron oligonucleótidos complementarios a las secuencias que flanquean el sitio de clonación múltiple del vector así como oligonucleótidos específicos para el fragmento de ADN deseado (Tabla 3). Estas reacciones de PCR se hicieron generalmente utilizando la polimerasa *GoTaq DNA Polymerase* (Promega), en una mezcla de reacción compuesta por: 4 µl de tampón (5x); 1,2 µl

de MgCl₂ (25 mM); 0,5 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno); 1 µl de oligonucleótido 1 (10 µM); 1 µl de oligonucleótido 2 (10 µM); 0,1 µl (0,5 U) de ADN polimerasa; 0,25 µg de plásmido o un fragmento de la colonia y H₂O miliQ estéril hasta 20 µl. Las condiciones para estas PCRs fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min; 35 ciclos compuestos por desnaturalización del ADN a 95 °C durante 30 s, unión de los cebadores a una temperatura específica para cada pareja de oligonucleótidos (T_m) durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1 min por cada 1 kb del fragmento de ADN a amplificar; y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Tabla 3. Parejas de oligonucleótidos usados para el escrutinio de bacterias mediante análisis por PCR y para secuenciación. En la tabla se muestran las parejas de oligonucleótidos, junto con sus secuencias de nucleótidos usadas como cebadores en el análisis por PCR de las bacterias transformadas con las construcciones en los vectores *pGEMT-Easy*, *pET30b⁺*, *pXCShAStrep* y *pFGC594*, así como para la secuenciación de las mismas. Además, en la tabla se indica la temperatura de hibridación (T_m) usada para cada pareja de oligonucleótidos.

<i>Vector</i>	<i>Cebadores (5' - 3')</i>	<i>T_m</i>
<i>pGEMT-Easy</i>	T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) y SP6 (GATTTAGGTGACACTATAG)	58 °C
<i>pET30b⁺</i>	T7 y T7-Ter (GCTAGTTATTGCTCAGCGG)	56 °C
<i>pXCShAStrep</i>	pXCS-5196D (GATTGATGTGATATCTCCACT) y pXCS-98R (AGAGACTGGTGATTTTTGC)	56 °C
<i>pFGC594</i>	pFGC-2645.D (GAGGACACGCTCGAGTATA) pFGC-4254.R (GAGCTACACATGCTCAGGT).	54 °C

11. Secuenciación

La secuenciación de ácidos nucleicos se realizó en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (S.C.A.I.) de la Universidad de Córdoba. Para ello, se usaron entre 0,2 y 0,4 µg de ADN plasmídico y 3,2 pmoles de cebador.

Los oligonucleótidos usados para la secuenciación de las diferentes construcciones se indican en la Tabla 3.

12. Bases de datos y programas informáticos

Para la búsqueda de secuencias se usaron las bases de datos del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) y la base de datos *Phytozome* (<http://www.phytozome.net>).

El análisis de las secuencias, alineamiento y generación de cladogramas se llevó a cabo usando las herramientas del paquete informático *Lasergene* (DNASTAR).

Para el diseño de oligonucleótidos se usaron los programas *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu>) y *Oligo6* (Molecular Biology Insights, Inc.).

La identificación de posibles motivos funcionales en la proteína PvAAH se hizo a través de los programas *TargetP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>), *PsortII* (<http://psort.hgc.jp/form2.html>), *PlantsP* (<http://plantsp.genomics.purdue.edu>) y *NetPhos2.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>).

Para la predicción de motivos reguladores en la región promotora del gen *PvAAH* se usaron las bases de datos BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>) y PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>).

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este trabajo se hizo mediante la prueba t de *Student*, usando el programa informático *Graphpad* (Graphpad Software).

13. Separación electroforética de proteínas

La separación electroforética de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS (Laemmli, 1970). Todas las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta de electroforesis *Mini Protean III* (Bio-rad). Las muestras se mezclaron con tampón de carga en relación 1/1 (v/v) y se calentaron a 98 °C durante 5 min. La electroforesis se llevó a cabo a 30 voltios durante 2 horas con tampón de electroforesis con SDS al 0,1%. La composición del gel separador fue:

Tris-HCl 375 mM (pH 8,8); SDS al 0,1% (p/v); APS (persulfato amónico) al 0,05% (p/v); TEMED al 0,1% (p/v) y acrilamida/bis-acrilamida al 10%. La composición del gel concentrador fue: 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/bis-acrilamida al 4%.

En los geles se incluyeron marcadores de peso molecular con objeto de obtener una estimación del tamaño y cantidad de proteína presente en cada uno de los pocillos. Se utilizaron los marcadores de peso molecular pre-teñidos *Prestained SDS-PAGE Standards* (Bio-rad) y *PageRule Prestained Protein Ladder* (Fermentas).

Una vez separadas las proteínas se tiñeron con una solución de Azul de Coomassie diluido, cuya baja concentración tiñe sólo las proteínas y, por tanto, no es necesario desteñir los geles (Zehr *et al.*, 1989), o bien con tinción de plata usando el kit *Silver Stain* (Bio-rad).

Tampón de electroforesis: Tris-HCl 25 mM (pH 8,3); glicina 192 mM y SDS al 0,1% (p/v).

Tampón de carga Laemmli: Tris-HCl 100 mM (pH 6,8); β -mercaptoetanol 71,5 mM; SDS al 2% (p/v); azul de bromofenol al 0,025% (p/v) y glicerol al 10% (v/v).

Solución Coomassie “one step”: etanol al 10%; ácido acético al 5% y Coomassie R-250 al 0,0016%.

14. Electrotransferencia y análisis por Western blot

Tras la electroforesis, las proteínas presentes en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Sigma-Aldrich) mediante electrotransferencia en una cubeta *Mini-TransBlot* (Bio-rad).

La membrana de PVDF se activó sumergiéndola en metanol absoluto durante 3 min y se mantuvo en tampón de transferencia hasta su uso. La transferencia se realizó a 200 mA durante 2 h a 4 °C. 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 con

agitación constante. A continuación, se añadió el anticuerpo primario, diluido a la concentración adecuada en tampón T-TBS, y se incubó con agitación durante 1 h a temperatura ambiente (anticuerpos monoclonales) o durante 12 h a 4 °C (anticuerpos policlonales). Seguidamente, la membrana se lavó 3 veces con tampón T-TBS durante 10 min. Se añadió el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, diluido a 1:15.000 en tampón T-TBS, y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente con agitación. La membrana se lavó 3 veces con tampón T-TBS durante 10 min y, finalmente, se incubó con el tampón de desarrollo de la actividad fosfatasa durante 1 - 5 min.

Para el análisis por Western blot de la expresión y purificación de la proteína recombinante His₆-PvAAH, como anticuerpo primario se usaron anticuerpos monoclonales que reconocen la cola de poli-histidinas (H1029 Sigma-Aldrich), diluidos a 1:15.000 en tampón TBS. Para el análisis de la expresión y purificación de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep, como anticuerpo primario se usaron anticuerpos monoclonales que reconocen el epítipo HA (2-2.2.14, Pierce), diluidos a 1:2.500 en tampón TBS. Como anticuerpos secundarios para el análisis por Western blot de la expresión y purificación, tanto de la proteína His₆-PvAAH como de la PvAAH-HA-Strep, se usaron anticuerpos conjugados a la fosfatasa alcalina que reconocen las inmunoglobulinas G (IgG) de ratón (A3562, Sigma), mientras que para el análisis de la expresión de la proteína PvAAH, utilizando como anticuerpo primario los anticuerpos policlonales desarrollados en conejo frente a la proteína His₆-PvAAH, se usaron anticuerpos conjugados a la fosfatasa alcalina que reconocen la IgG de conejo (A3687, Sigma).

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.

15. Análisis por PCR cuantitativa (qPCR)

15.1. Tratamiento con ADNasa

Para eliminar cualquier traza de ADN genómico, el ARN (Materiales y Métodos, apartado 5.4) usado para el análisis por PCR cuantitativa se trató con ADNasa I (Invitrogen). Para ello, se mezcló 1 µl de tampón (10x) con 1 U de ADNasa I, 2,5 µg de ARN y H₂O miliQ estéril hasta 10 µl. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se añadió 1 µl de EDTA 50 mM y se incubó a 65 °C durante 10 min, para inactivar la enzima. Para verificar que el ADN había sido eliminado, se comprobó la ausencia de amplificación del ARN ribosomal 18S, usando el ARN tratado con ADNasa I como molde y los oligonucleótidos 18S-1 (5'-CAAAGCAAGCCTACGCTCT-3') y 18S-2 (5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'). Para la amplificación se usó la enzima *GoTaq DNA Polymerase* (Promega), en una mezcla de reacción compuesta por: 4 µl de tampón (5x); 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM; 0,5 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno); 1 µl de oligonucleótido 18S-1 (10 µM); 1 µl de oligonucleótido 18S-2 (10 µM); 0,1 µl (0,5 U) de ADN polimerasa; 1 µl de ARN tratado con ADNasa I y H₂O miliQ estéril hasta 20 µl. Las condiciones para estas PCRs fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min seguida de 30 ciclos de 95 °C durante 1 min, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min; y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de estas PCRs se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (Materiales y Métodos, apartado 7.1).

15.2. Síntesis de ADNc

El ADNc usado para el análisis mediante qPCR se sintetizó a partir de 2,5 µg de ARN previamente tratado con ADNasa I usando la retrotranscriptasa *iScript cDNA Synthesis* (Bio-rad) en una reacción compuesta por: 4 µl de tampón (5x); 1 µl de retrotranscriptasa; 2,5 µg de ARN tratado con ADNasa y H₂O miliQ estéril hasta 20 µl. Esta mezcla se incubó a 25 °C durante 5 min, a continuación a 42 °C

durante 30 min y finalmente la mezcla se calentó a 85 °C durante 5 min para inactivar la enzima.

Antes de utilizar estos ADNc para el análisis por qPCR, se comprobó la cantidad e integridad del ADNc sintetizado mediante la amplificación por PCR del gen de la *Actina 2*. Para ello, se usó la enzima *GoTaq DNA Polymerase* (Promega) y los oligonucleótidos actina2.5' (5'-ACGAGACCACATACAACCTC CATAAT-3') y actina2.3' (5'-TGCTTCCAGACAAATCATCATAGTA-3'), en una mezcla de reacción y con un programa de PCR iguales a los usados en el apartado anterior.

15.3. PCR cuantitativa o en tiempo real

Las PCRs cuantitativas se hicieron en un equipo *iCycler iQ* (Bio-rad) usando el reactivo comercial *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-rad) y oligonucleótidos (cebadores) específicos para cada uno de los genes analizados (Tabla 4). Cada reacción estaba compuesta por: 8 µl de tampón (2x); 0,32 µl de oligonucleótido 1 (10 µM); 0,32 µl de oligonucleótido 2 (10 µM); 1 µl de ADNc diluido 1/3 y H₂O miliQ estéril hasta 16 µl. El programa de PCR usado consistía en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min seguida por 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s.

La fluorescencia emitida por el *SYBR Green* se midió durante la etapa de extensión de cada ciclo. La especificidad de los cebadores se verificó mediante curvas de desnaturalización para cada amplicón una vez finalizada la PCR. Para ello, se efectuó un calentamiento desde 60 °C hasta 100 °C, incrementando la temperatura 0,5 °C por min. La eficiencia de amplificación de las diferentes parejas de cebadores usados para el análisis por PCR cuantitativa se determinó mediante diferentes reacciones de PCR usando como molde diluciones del ADNc sintetizado a partir de muestras de raíces y hojas de plantas de judía. La eficiencia de todas las parejas de cebadores usados fue superior al 90%. Los valores de Ct (ciclo umbral) se calcularon usando el software del equipo *iCycler iQ* (Bio-rad) y

estuvieron comprendidos entre los ciclos 20 y 35 para todos los genes analizados. Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron frente a la expresión del gen de la *Actina 2*, empleado como gen de referencia, y se analizaron siguiendo el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como describen Livak y Schmittgen (2001). Todas las reacciones se hicieron por triplicado (repeticiones técnicas) usando preparaciones de ARN procedentes de 3 experimentos diferentes.

Tabla 4. Cebadores usados para el análisis mediante PCR cuantitativa. En la tabla se muestran las diferentes parejas de oligonucleótidos usados como cebadores para el análisis por PCR cuantitativa de la expresión de los genes de la actina 2, uricasa (*PvUO*), alantoinasa 1 (*PvALN.1*), alantoinasa 2 (*PvALN.2*) y alantoato amidohidrolasa (*PvAAH*).

<i>Gen</i>	<i>Cebadores (5' - 3')</i>
<i>Actina 2</i>	PvACT.5' (GGAGAAGATTTGGCATCACACGTT) PvACT.3' (GTTGGCCTTGGGATTGAGTGGT)
<i>PvUO</i>	PvUO.5' (TCTCTTCTCTGATTGCGTCAACTCGTA) PvUO.5' (CCTTTGCTTTTGCATACACCGTGT)
<i>PvALN.1</i>	PvALN1.5' (CACATGAGTTAGTTAAATATTGACAGGT) PvALN1.3' (GGATATAATATAATACATGCAAACGCAC)
<i>PvALN.2</i>	PvALN2.5' (TCCACCAAGCATAACCATGA) PvALN2.3' (ATTTTCATGCAATGATATGTGAAGAC)
<i>PvAAH</i>	PvAAH.5' (GAGATTGGGAAGCATTGGTGCCTA) PvAAH.3' (GTGGGGCGGCTGTTTATGGT)

16. Amplificación del ADNc *PvAAH*

16.1. Síntesis de ADNc mediante el kit *SMART-RACE*

Para amplificar el ADNc completo del gen *PvAAH* se utilizó el kit comercial *SMART-RACE* (Clontech), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todos los tampones, reactivos y oligonucleótidos usados en este apartado fueron suministrados en el kit. Con este método, a partir de ARN extraído de hojas jóvenes de plantas de judía (Materiales y Métodos, apartado 5.4) se obtuvieron dos poblaciones de ADNc de primera cadena. Una población 5'-RACE, en la que el oligonucleótido SMART II se introduce en el extremo 5' del ADNc, mientras

que el oligonucleótido 5'-CDS (que incorpora la secuencia complementaria al oligonucleótido UPM) actúa como cebador en la retrotranscripción, y una población 3'-RACE, en la que la secuencia SMART II se introduce junto con el cebador 3'-CDS en el extremo 3' del ADNc.

Para la síntesis del ADNc 5'-RACE se mezclaron: 2,5 µg de ARN total de judía; 1 µl del oligonucleótido 5'-CDS (10 µM); 1 µl del oligonucleótido SMART II (10 µM) y H₂O miliQ estéril hasta 5 µl. Para la síntesis del ADNc 3'-RACE se mezclaron: 2,5 µg de ARN total de judía; 1 µl del oligonucleótido 3'-CDS (10 µM) y H₂O miliQ estéril hasta 5 µl. Ambas mezclas se incubaron a 70 °C durante 2 min, se enfriaron en hielo durante 2 min y se centrifugaron brevemente. A continuación, a cada una de las anteriores mezclas se les añadieron: 2 µl de tampón (5x); 1 µl de DTT (20 mM); 1 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno) y 1 µl de retrotranscriptasa. Ambas reacciones se mezclaron por pipeteo y se incubaron a 42 °C durante 90 min. Transcurrido este tiempo, se le añadieron 20 µl de tampón Tricina-EDTA y se incubaron a 72 °C durante 7 min para inactivar la enzima. El ADNc así obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

16.2. Amplificación de los fragmento 5' y 3'-RACE del ADNc PvAAH

Para aislar los fragmentos 5'- y 3'-RACE del ADNc PvAAH se llevaron a cabo diferentes reacciones de PCR usando como molde las poblaciones de ADNc 5'- y 3'-RACE junto con un oligonucleótido inespecífico (UPM, suministrado con el kit SMART-RACE, complementario a la secuencia SMART II) y un oligonucleótido específico del ADNc PvAAH (GSP2 o GSP1). Para la amplificación, se usó la mezcla de polimerasas suministrada con el kit *Advantage 2 PCR* (Clontech) según las instrucciones del fabricante.

Para amplificar el fragmento 5'-RACE, se usó como molde el ADNc 5'-RACE y el oligonucleótido específico GSP1 (5'-TGGACATTGGCACTGTTCC AGCATG-3') en una mezcla de reacción compuesta por: 2,5 µl de tampón (10x);

0,5 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada); 0,5 µl de *Advantage* ADN polimerasa; 1,3 µl de ADNc 5'-RACE; 2,5 µl de oligonucleótido UPM (10x); 0,5 µl de oligonucleótido GSP1 (10 µM) y H₂O miliQ estéril hasta los 25 µl. Para la amplificación del fragmento 3'-RACE se usó una mezcla de PCR igual a la anterior, salvo que como molde se usó el ADNc 3'-RACE y como oligonucleótido específico se usó el oligonucleótido GSP2 (5'-GAGAACTCAATTGACATCACAGAGGA-3').

Las condiciones de PCR usadas para amplificar los fragmentos 5'- y 3'-RACE del ADNc *PvAAH* fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 96 °C durante 2 min; 5 ciclos de 94 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min; 5 ciclos de 94 °C durante 30 s, 70 °C durante 3 s y 72 °C durante 3 min; 25 ciclos de 94 °C durante 30 s; 68 °C durante 3 s y 72 °C durante 3 min; y extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos de estas PCRs se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tras su aislamiento y purificación (Materiales y Métodos, apartado 5.3) se clonaron en el vector *pGEMT-Easy* (Materiales y Métodos, apartado 8). Una vez obtenidos los clones positivos, se verificó la secuencia de los insertos mediante secuenciación (Materiales y Métodos, apartado 11).

16.3. Amplificación del ADNc completo del gen *PvAAH*

El ADN completo del gen *PvAAH* se amplificó por PCR a partir del ADN 5'-RACE usando como cebadores los oligonucleótidos Pv.ALCO.5' (5'-GAGATTGGGAAGCATTGGTG-3') y PvALCO.3' (5'-TGCTTTACACAGTTATCATATCACTCA-3'), complementarios a las secuencias 5' y 3' no codificantes del ADNc *PvAAH*. Para la amplificación, se usó la mezcla de polimerasas suministrada con el kit *Advantage 2 PCR* (Clontech) en una mezcla de reacción compuesta por: 2,5 µl de tampón (10x); 0,5 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada); 0,5 µl de *Advantage* ADN polimerasa; 1,3 µl de ADNc 5'-RACE; 1 µl del oligonucleótido Pv.ALCO.5' (10 µM); 1 µl del oligonucleótido

PvALCO.3' (10 μ M) y H₂O miliQ estéril hasta los 25 μ l. Las condiciones de esta PCR fueron: desnaturalización inicial a 96 °C durante 3 min; 35 ciclos de 94 °C durante 45 s, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min; y extensión final a 72 °C durante 7 min.

El producto de esta PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y se clonó en el vector *pGEMT-Easy*.

17. Análisis por Southern blot

Se usó el protocolo descrito por Southern (1975) con algunas modificaciones.

17.1. Digestión del ADN genómico de judía

Se digirió ADN genómico de judía con las enzimas de restricción *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI* y *HindIII* + *PstI*. Se usaron 4 mezclas de reacción compuestas por: 5 μ l de tampón (10x); 60 U de enzima de restricción; 15 μ g de ADN genómico y H₂O miliQ estéril hasta 50 μ l. Las digestiones del ADN genómico se incubaron durante 12 h a 37 °C. Trascorrido este tiempo, las 4 reacciones se incubaron a 65 °C durante 10 min para inactivar las enzimas.

17.2. Trasferencia de ADN o Southern blot

El ADN genómico ya digerido se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se incubó con la solución depurinizante durante 10 min. A continuación, se incubó en el tampón de desnaturalización durante 30 min y, por último, con el tampón de neutralización durante otros 30 min. Todos los lavados se hicieron con agitación leve y entre cada uno de ellos el gel se lavó con agua destilada. Por último, el ADN genómico se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon *Hybond-N+* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante y con tampón SSC (20x) como tampón de transferencia.

Solución depurinizante: HCl 0,1 N.

Tampón desnaturalizante: NaCl, 87,66 g/l; y NaOH, 20 g/l.

Tampón de neutralización: Tris, 60,5 g/l; y NaCl, 87,66 g/l. El pH se ajustó a 7,5 con HCl.

Tampón SSC (20x): citrato sódico, 88,23 g/l; y NaCl, 175,32 g/l.

17.3. Fijación del ADN a la membrana de nailon

Una vez transferido el ADN genómico, la membrana se lavó en tampón SSC (2x) y se colocó sobre un papel Whatmann 3MM, manteniendo hacia arriba la superficie de la membrana que había estado en contacto con el gel de agarosa. La fijación del ADN a la membrana se realizó por irradiación con 1.200 kJ de luz UV de una λ de 260 nm durante 50 s, usando para ello el equipo *Stratalinker* (Stratagene).

17.4. Obtención de sondas marcadas con digoxigenina

Para el marcaje se utilizó un fragmento del gen *PvAAH* clonado en el vector *pGEMT-Easy* (*pGEMT-Easy:PvAAH*). Para obtener el fragmento se usó la enzima de restricción *PstI* para digerir la construcción *pGEMT-Easy:PvAAH*. El producto de esta digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se aisló un fragmento de ADN de 599 pb que correspondía a la región 3' del ADNc *PvAAH* (desde el nucleótido 993 hasta el 1.592). Una vez purificado, este fragmento del ADNc *PvAAH* se marcó con digoxigenina (sonda) mediante el método de cebado al azar, utilizando el kit *DIG DNA Labeling and Detection* (Roche). Todos los reactivos y tampones usados en el marcaje del ADN fueron suministrados junto con el kit. Para el marcaje, 250 ng del fragmento de ADNc purificado se diluyeron en agua miliQ estéril hasta un volumen de 15 μ l. A continuación, la solución se incubó a 100 °C durante 5 min e inmediatamente después se enfrió en hielo durante 2 min. Una vez desnaturalizado el ADN, se le añadieron 2 μ l de mezcla de hexanucleótidos, 2 μ l de mezcla de dNTPs (1 mM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP y 0,35 mM de DIG-11-dUTP) y 1 μ l de fragmento

Klenow de la ADN polimerasa I (2 U/ μ l). Esta mezcla se incubó durante 20 h a 37 °C.

17.5. Hibridación de la membrana

La membrana se incubó durante 90 min a 42 °C con la solución de hibridación antes de añadir la sonda (prehibridación). Transcurrido este tiempo, a la solución de hibridación se le añadió el fragmento del ADNc *PvAAH* marcado con digoxigenina, previamente desnaturalizado, y se incubó la membrana con esta solución durante 12 h a 42 °C. Para desnaturalizar la sonda, esta se incubó a 100 °C durante 5 min e inmediatamente después se enfrió en hielo durante 2 min.

Todo el proceso de prehibridación e hibridación se llevó a cabo en tubos cilíndricos, en un horno de hibridación rotatorio para asegurar la distribución homogénea de las soluciones.

Tampón de hibridación: tampón fosfato 50 mM (pH 7), tampón SSC 5x; SDS al 7%; formamida desionizada al 50%; leche desnatada en polvo al 2% y N-laurilsarcosina al 0,1%.

17.6. Lavados de la membrana

Para comprobar la especificidad de la unión de la sonda al ADN fijado en la membrana, se realizaron 4 lavados a la membrana. Dos lavados consecutivos con una solución de SSC (2x) y SDS al 0,1%, durante 5 min a temperatura ambiente y dos lavados más con una solución de SSC (0,5x) y SDS al 0,1% durante 15 min a 55 °C. Los lavados de la membrana se hicieron en tubos cilíndricos en un horno de hibridación rotatorio.

17.7. Detección de las señales de hibridación

Una vez finalizados los lavados, la membrana se incubó durante 5 min con la solución de lavado. A continuación, se eliminó la solución de lavado y se añadió la solución de bloqueo con la que se incubó la membrana durante 30 min, en

agitación. Transcurrido este tiempo, se añadió el anticuerpo frente a digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1/5.000 en la solución de bloqueo, y se incubó con la membrana durante 45 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se retiró el anticuerpo frente a digoxigenina y la membrana se lavó dos veces durante 15 min con agitación con la solución de lavado. Por último, la membrana se incubó con la solución de revelado hasta que apareció la señal correspondiente a la actividad fosfatasa. Para detener la reacción se lavó la membrana con tampón TE.

Tampón de ácido málico: ácido málico 0,1 M y NaCl 0,15 M. Ajustar a pH 7,8 con NaOH.

Solución de bloqueo: diluir 10 veces la solución de bloqueo (10x, suministrada con el kit *DIG DNA Labeling and Detection*) en tampón de ácido málico.

Solución de lavado: ácido málico 0,1 M; NaCl 0,15 M y Tween-20 al 0,3%. Ajustar pH a 7,5 con NaOH.

Solución de revelado: Tris-HCl 0,1 M (pH 9,5); NaCl 0,1 M y solución de NBT/BCIP al 2% (v/v; suministrado por el kit *DIG DNA Labeling and Detection*).

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM (pH 8).

18. Amplificación de un fragmento del ADN genómico de judía que contiene la secuencia codificante del gen *PvAAH*

Para aislar el fragmento de ADN genómico que contiene el gen de la alantoato amidohidrolasa de judía se hicieron diferentes PCRs usando como molde ADN genómico de judía (Materiales y Métodos, apartado 5.1.2) y como cebadores los oligonucleótidos PvALCO.5' y PvALCO.3', complementarios a las secuencias 5' y 3' no codificantes del ADNc *PvAAH*. Para la amplificación, se usó la polimerasa *iProof High-Fidelity* (Bio-rad), en una mezcla de reacción compuesta por: 4 µl de tampón (5x); 0,5 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada); 1 µl de oligonucleótido PvALCO.5' (10 µM); 1 µl de oligonucleótido PvALCO.3' (10 µM); 0,5 µg de ADN genómico; 0,2 µl (4 mU) de ADN polimerasa y H₂O miliQ estéril hasta 20 µl. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C

durante 30 s, seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 10 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 3 min, y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

El producto de estas PCRs se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, se aisló, se purificó (Materiales y Métodos, apartado 5.3) y se determinó su secuencia empleando varias reacciones de secuenciación, hasta obtener la secuencia del fragmento completo (Materiales y Métodos, apartado 11). Para la secuenciación se usaron los oligonucleótidos PvALCO.5', PvALCO.3', GSP1 y GSP2, antes descritos.

19. Amplificación de la región promotora del gen *PvAAH*

19.1. Construcción de librerías de ADN genómico de judía

Se generaron 6 librerías de ADN genómico de judía usando el kit *GenomeWalker Universal kit* (Clontech). El ADN genómico de judía se digirió con las enzimas de restricción *DraI*, *EcoRV*, *HapI*, *PvuII*, *StuI*, y *SmaI* que generan extremos romos. Para las digestiones se prepararon 6 reacciones independientes compuestas por: 10 µl de tampón (10x); 100 U de enzima de restricción; 2,5 µg de ADN genómico de alta pureza y H₂O miliQ estéril hasta 100 µl. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 18 h.

Una vez digerido, el ADN genómico de judía se purificó como se explica a continuación: a cada digestión se le añadieron 95 µl de fenol, se mezcló por agitación en vórtex y se centrifugó a 14.000 g a temperatura ambiente durante 5 min; a continuación, se recogió la fase superior acuosa, se añadieron 95 µl de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14.000 g a temperatura ambiente durante 5 min; se recogió de nuevo la fase acuosa y se añadieron 190 µl de etanol al 95% frío, 9,5 µl de acetato sódico 3 M y 20 µg de glucógeno (G1767, Sigma); seguidamente, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se añadieron sobre el precipitado 100 µl de etanol al 80%; por último, se centrifugó a 14.000 g durante 1 min a 4 °C, se

eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 20 μ l de agua miliQ estéril.

Una vez purificados, los diferentes fragmentos de ADN genómico se ligaron al adaptador *GenomeWalker Adaptor*, suministrado por el kit. Para ello se mezclaron: 1,6 μ l de tampón de ligación (10x); 4 μ l de ADN genómico digerido y purificado; 1,9 μ l de *GenomeWalker Adaptor* (25 μ M) y 0,5 μ l (3 U) de ADN ligasa T4. Esta mezcla se incubó a 16 °C durante 12 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se incubó a 70 °C durante 5 min para inactivar la enzima y, a continuación, se añadieron 72 μ l de agua miliQ estéril. Las librerías de ADN genómico obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

19.2. Amplificación de un fragmento de la región promotora del gen PvAAH

Para amplificar la región promotora del gen *PvAAH* se llevaron a cabo dos rondas de PCRs usando la mezcla de polimerasas suministradas con el kit *Advantage 2 PCR* (Clontech). En la primera ronda de PCRs se usaron como molde cada una de las diferentes librerías de ADN genómico generadas con el kit *GenomeWalker* (Clontech) junto con el oligonucleótido AP1 (suministrado con el kit y complementario al adaptador *GenomeWalker Adaptor*) y el oligonucleótido específico GSP1. Estas reacciones de PCR estaban compuestas por: 2 μ l de tampón (10x); 0,4 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM de cada); 0,4 μ l de *Advantage* ADN polimerasa; 0,4 μ l de la librería de ADN genómico; 1 μ l del oligonucleótido GSP.1 (10 μ M); 1 μ l del oligonucleótido AP1 (10 μ M) y H₂O miliQ estéril hasta 20 μ l. Las condiciones de estas reacciones de PCR fueron las siguientes: 7 ciclos de 94 °C durante 25 s y 72 °C durante 3 min; 35 ciclos de 94 °C durante 25 s y 67 °C durante 3 min; y extensión final a 67 °C durante 7 min.

A continuación, se llevó a cabo una segunda ronda de PCRs similar a la anterior pero usando como molde una dilución 1/50 del producto de las primeras PCRs, junto con el oligonucleótido AP2 (suministrado con el kit y complementario al adaptador *GenomeWalker Adaptor*) y el oligonucleótido

específico PvAAH-5'.Rev (5'-GTGGTGGTGGTGTAAAGACAT-3'). Las condiciones de estas reacciones de PCR fueron las siguientes: 5 ciclos compuestos por 94 °C durante 25 s y 72 °C durante 3 min; 20 ciclos compuestos por 94 °C durante 25 s y 67 °C durante 3 min; y extensión final a 67 °C durante 7 min.

Los productos de esta segunda ronda de PCRs se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y, tras ser purificados, se clonaron en el vector *pGEMT-Easy*.

20. Expresión en *Escherichia coli* y purificación de la proteína recombinante His₆-PvAAH

20.1. Clonación de la secuencia codificante del ADNc PvAAH en el vector pET30b⁺

La secuencia codificante del ADNc *PvAAH*, sin incluir la secuencia del péptido señal (desde el nucleótido 213 hasta el 1.566), se amplificó por PCR usando como molde la construcción *pGEMT-Easy:PvAAH*. Para la amplificación se usó la mezcla de polimerasas suministrada con el kit *Advantage 2 PCR* (Clontech), junto con los oligonucleótidos PvAAH2 (5'-CATGCCCATGGGTATTGAGACA-3') y PvAAH3 (5'-GCCTCGAGTCATGATGATAGATTTTC-3'), que contenían la secuencia de corte de las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* (que se indican subrayadas), respectivamente. La mezcla de reacción de PCR contenía: 2 µl de tampón (10x); 0,4 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada); 0,4 µl de *Advantage* ADN polimerasas; 0,5 µg del plásmido *pGEMT-Easy:PvAAH*; 1 µl del oligonucleótido PvAAH2 (10 µM); 1 µl del oligonucleótido PvAAH3 (10 µM) y H₂O miliQ estéril hasta 20 µl. Las condiciones de esta reacción de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min; 30 ciclos de 95 °C durante 45 s, 55 °C durante 30 s y 68 °C durante 90 s; y extensión final a 68 °C durante 7 min.

El producto de esta PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se aisló un fragmento de ADN de 1.325 pb. Una vez purificado, este fragmento del ADN se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*, que se usaron también para digerir el vector *pET30b*⁺. Los productos de estas digestiones se separaron en un gel de agarosa y se aislaron aquellos fragmentos de ADN cuyo tamaño coincidía con el correspondiente al ADNc *PvAAH* y con el del vector *pET30b*⁺. Una vez purificados, estos fragmentos de ADN se unieron mediante la ADN ligasa T7 y con el producto de esta ligación se transformó la cepa DH5 α de *E. coli* (Materiales y Métodos, apartado 9.1). A continuación, se seleccionaron mediante análisis con endonucleasas de restricción y por PCR aquellas bacterias que contenían la construcción *pET30b*⁺:*PvAAH* (Materiales y Métodos, apartado 10). Por último, se confirmó mediante secuenciación que la secuencia del ADNc *PvAAH* clonada en el vector *pET30b*⁺ estaba en fase y no contenía ninguna mutación que impidiera la expresión de la proteína. Finalmente, con esta construcción se transformó la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*.

20.2. Expresión y purificación de la proteína His₆-PvAAH

A partir de una colonia de la cepa BL21 de *E. coli* que contenía la construcción *pET30b*⁺:*PvAAH* se inocularon 3 ml de un cultivo líquido de medio LB líquido con kanamicina (50 μ g/ml). Tras 12 horas en agitación a 37 °C, 1 ml de este cultivo se usó para inocular 50 ml de medio LB líquido con kanamicina (50 μ g/ml). Este cultivo se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,5 y 0,8 (aproximadamente 12 horas). Una vez alcanzada esta densidad de células, se inició la inducción de la expresión de la proteína His₆-PvAAH, mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,5 mM, y el cultivo se incubó durante 6 h más en agitación a 37 °C. Para inducir la expresión de la proteína His₆-PvAAH, se ensayaron diferentes concentraciones de IPTG y varias temperaturas de incubación. No obstante, en todos los casos se obtuvieron niveles de inducción muy similares. Trascorrido el tiempo de inducción, se recogieron las

células mediante centrifugación a 1.100 g durante 10 min a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las células precipitadas se resuspendieron en 40 ml de la solución 1 y se rompieron por sonicación (8 pulsos de 5 segundos) con un equipo *Vibra Cell* (Sonics). Posteriormente, el lisado celular se centrifugó a 14.000 g durante 15 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 40 ml de la solución 1. Se repitió la sonicación, se centrifugó a 14.000 g durante 15 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 5 ml de la solución 2 y, tras 10 min en agitación a temperatura ambiente, se incubó durante 50 min en hielo. La suspensión resultante se centrifugó a 14.000 g a temperatura ambiente durante 20 min y se recogió el sobrenadante.

Para la purificación de la proteína His₆-PvAAH fue necesario usar condiciones desnaturalizantes que permitieran la solubilización de esta proteína. Para ello, como ya se ha explicado, durante la extracción de esta proteína se incluyó urea 8 M en las soluciones 2, 3, 4 y 5. La proteína His₆-PvAAH se purificó por unión a níquel en una columna empaquetada con 10 ml de resina *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) del siguiente modo: el sobrenadante obtenido tras la incubación con la solución 3 se cargó en una columna empaquetada con la resina *Chelating Sepharose*, previamente activada con una solución de níquel y equilibrada con la solución 2; a continuación la columna se lavó de forma consecutiva con 6 ml de las soluciones 2, 3, 4 y finalmente la proteína unida a la resina se eluyó al lavar la columna con 6 ml de la solución 5.

Solución 1: tampón fosfato 20 mM (pH 7,8) y NaCl 0,5 M.

Solución 2: tampón fosfato 20 mM (pH 7,8); NaCl 0,5 M y urea 8 M.

Solución 3: tampón fosfato 20 mM (pH 6); NaCl 0,5 M y urea 8 M.

Solución 4: tampón fosfato 20 mM (pH 5,3); NaCl 0,5 M y urea 8 M.

Solución 5: tampón fosfato 20 mM (pH 4); NaCl 0,5 M y urea 8 M.

21. Obtención y purificación de anticuerpos frente a la proteína His₆-PvAAH

La proteína recombinante His₆-PvAAH purificada como se ha descrito en el apartado anterior se usó para obtener anticuerpos policlonales, para lo que se usaron las facilidades del Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba. Antes de la inmunización, se eliminaron la urea y las sales presentes en las fracciones con la proteína His₆-PvAAH purificada. Para ello, estas fracciones se dializaron a través de una membrana de celulosa (Sigma) usando 500 ml de tampón fosfato 17,5 mM (pH 7) durante 12 horas a 4 °C, renovando el tampón varias veces durante la diálisis. Con estas fracciones se inmunizaron dos hembras de conejo. La primera inmunización se realizó vía intradérmica con 250 µg de proteína emulsionada con adyuvante completo de Freund. El resto de inmunizaciones se hizo vía intramuscular con 125 µg de antígeno con adyuvante incompleto de Freund. Las inmunizaciones se repitieron 4 veces, con un intervalo de dos semanas entre cada una de ellas.

La fracción de Igs, tanto del suero preinmune (recogido antes de la primera inmunización) como del suero inmune, se aisló mediante precipitación con sulfato de amonio, seguido de una cromatografía de afinidad por intercambio iónico en una columna de *DEAE Sephacel* (GE Healthcare). Para ello, a 2 ml de suero se le añadió sulfato de amonio hasta alcanzar el 40% de saturación. La solución se agitó durante 30 min a 4 °C y se centrifugó a 14.000 g durante 30 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 200 µl de una solución de sulfato de amonio 1,75 M y se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 400 µl de tampón fosfato 17,5 M (pH 7) y se dializó para eliminar las sales a través de una membrana de celulosa (Sigma), usando 500 ml de tampón fosfato 17,5 M (pH 7) durante 12 horas a 4 °C, durante los cuales el tampón se renovó varias veces. Posteriormente, el volumen dializado se pasó por una columna de *DEAE Sephacel* previamente equilibrada con tampón fosfato 17,5 M (pH 7). La columna se lavó con varios volúmenes de tampón fosfato 17,5

M (pH 7) y se recogieron las fracciones del eluido. La concentración de proteína se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm, y se almacenaron las primeras fracciones con mayor contenido proteico, correspondientes a las proteínas no retenidas en la columna, que es donde se concentran las Igs.

La titulación de los anticuerpos purificados se llevó a cabo mediante análisis por Western blot empleando diluciones seriadas de los mismos. De este modo, se estimó que una dilución 1:1.000 contenía el título óptimo para estos ensayos.

22. Expresión en *Nicotiana benthamiana* y purificación de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep

Para la sobreexpresión en plantas de la proteína PvAAH se usaron plantas de *Nicotiana benthamiana* de menos de 4 semanas de edad.

22.1. Clonación de la secuencia codificante del ADNc PvAAH en el vector pXCSHAStrep

La secuencia codificante del ADNc PvAAH (desde el nucleótido 117 hasta el 1.565), excepto el codón de fin de lectura, se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos Ex.PvAAH.5' (5'- CCATCGATCCATGTCCTTACACCACC ACC-3') y Ex.PvAAH.3' (5'-GGGTGATAGATTTTCCAGAAATG-3'), que contenían la secuencia de corte para las enzimas de restricción *ClaI* y *SmaI* (se indican subrayadas), respectivamente. La reacción de PCR se llevó a cabo usando la polimerasa suministrada con el kit *iProof High-Fidelity PCR* (Bio-rad) en una mezcla compuesta por: 4 µl de tampón (5x); 0,4 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada); 0,4 µl de ADN polimerasa; 0,25 µg del plásmido *pGEMT-Easy:PvAAH*; 1 µl del oligonucleótido Ex.PvAAH.5' (10 µM); 1 µl del oligonucleótido Ex.PvAAH.3' (10 µM) y H₂O miliQ estéril hasta 20 µl. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 s; 30 ciclos

compuestos por 98 °C durante 10 s, 52 °C durante 20 s y 72 °C durante 90 s; y extensión final a 72 °C durante 10 min.

El producto de esta PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se aisló un fragmento de ADN de 1.448 pb. Una vez purificado, tanto el fragmento del ADNc *PvAAH* como el vector *pXCShAStrep* se digirieron con las enzimas de restricción *ClaI* y *SmaI*. El producto de estas digestiones, una vez purificado, se ligó usando la enzima ADN ligasa T7 y con la construcción resultante se transformó la cepa DH5 α de *E. coli*. Posteriormente, se aisló el ADN plasmídico de algunas de las bacterias transformadas con la construcción *pXCShAStrep:PvAAH* y se confirmó mediante secuenciación que la secuencia clonada en él estaba en fase y no contenía mutaciones. Con la construcción *pXCShAStrep:PvAAH* se transformó la cepa GV3101::pMP90RK de *A. tumefaciens* (Materiales y Métodos, apartado 9.2) que se utilizó para la expresión en planta de la proteína PvAAH-HA-Strep.

22.2. Expresión de la proteína PvAAH-HA-Strep en hojas de *N. benthamiana*

La cepa GV3101::pMP90RK de *Agrobacterium tumefaciens*, transformada con la construcción *pXCShAStrep:PvAAH*, y la cepa C58C1::pCH32 de *A. tumefaciens*, transformada con la construcción *pBIN61:P19*, se cultivaron en medio LB líquido con los antibióticos adecuados a 28 °C, hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,8 y 1,5 (12 - 16 h). Una vez alcanzada la densidad adecuada, las células de ambos cultivos se recogieron mediante centrifugación durante 10 min a 1.100 g, se resuspendieron en solución de inducción (MES-KOH 10 mM pH 5,6; MgCl₂ 10 mM y acetosiringona 150 μ M) y la suspensión de células se diluyó hasta una DO₆₀₀ de 0,5. A continuación, las dos suspensiones de *Agrobacterium* se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Tras la inducción, ambas suspensiones bacterianas se mezclaron en relación 1/1 y la mezcla se usó para infiltrar hojas expandidas de plantas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas de edad. Para ello, con una jeringa sin aguja se infiltraron entre 100 y 200 μ l de esta

mezcla en el envés de cada hoja. Se infiltraron 3 hojas por planta y al menos 3 plantas por construcción. Transcurridos 4 días, las hojas de *N. benthamiana* se recogieron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

22.3. Purificación de la proteína PvAAH-HA-Strep

La proteína recombinante PvAAH-HA-Strep se purificó mediante unión del epítipo StrepII, fusionado a esta proteína, y la resina *StrepTactin Sepharose* (GE Healthcare). Para ello, a 0,75 gramos de material congelado de hojas de *N. benthamiana* se añadieron 1,5 ml de tampón de extracción, la mezcla se homogeneizó y se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C. A continuación, se recogió el sobrenadante y se incubó con 40 µl de la resina *StrepTactin Sepharose* (suspensión al 50% en etanol) durante 10 min en agitación a 4 °C. Se centrifugó a 700 g durante 30 s, se eliminó el sobrenadante y la resina precipitada se resuspendió en 0,5 ml de tampón de lavado. Se centrifugó de nuevo a 700 g durante 30 segundos, se eliminó el sobrenadante y la resina precipitada se lavó 4 veces más con el tampón de lavado. Por último, para eluir la proteína unida a la resina, se añadieron 100 µl de tampón de elución, se incubó 5 min a temperatura ambiente con agitación suave y se centrifugó a 700 g durante 1 min. En el sobrenadante obtenido tras esta centrifugación se encontraba la proteína ya purificada.

La presencia de DTT en el tampón de lavado era necesaria para la unión de la proteína PvAAH-HA-Strep a la resina.

Tampón de extracción: Tea-NaOH 100 mM (pH 8); NaCl 150 mM; DTT 15 mM; MnCl₂ 1 mM y Triton X-100 al 0,5%.

Tampón de lavado: Tea-NaOH 100 mM (pH 8); NaCl 150 mM; DTT 2 mM; MnCl₂ 2 mM y Triton X-100 al 0,005%.

Tampón de elución: Tea-NaOH 100 mM (pH 8); NaCl 150 mM; DTT 2 mM; MnCl₂ 2 mM; Triton X-100 al 0,005% y 2,5 mM destiobiotina.

23. Silenciamiento del gen *PvAAH* en judía

23.1. Obtención de una construcción para silenciamiento génico del gen *PvAAH*

Se generó una construcción tipo “horquilla” empleando el vector *pFGC5941*, en el que se insertó un fragmento de la región 3' del gen *PvAAH*. Para ello, se amplificó por PCR el fragmento desde el nucleótido 1.009 hasta el 1.378 del ADNc *PvAAH* usando los oligonucleótidos SiPvAAH.5' (5'-GCTCTAGAGGCGCGCCGGAAAGCCTCTGTAAACA-3'), que contenía las secuencias de corte para las enzimas de restricción *XbaI* y *AscI* (se indican subrayadas) y SiPvAAH.3' (5'-CAGGATCCATTTAAATTGAATGTCACCCTCCATC-3'), que contenía las secuencias de corte para las enzimas de restricción *BamHI* y *SwaI* (se indican subrayadas). Se usó la polimerasa *GoTaq DNA polymerase* (Promega), en una mezcla de reacción compuesta por: 4 µl de tampón (5x); 1,2 µl de MgCl₂ (25 mM); 0,5 µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno); 1 µl del oligonucleótido SiPvAAH.5' (10 µM); 1 µl del oligonucleótido SiPvAAH.3' (10 µM); 0,1 µl (0,5 U) de ADN polimerasa; 0,25 µg del plásmido *pGEMT-Easy:PvAAH*; y H₂O miliQ estéril hasta 20 µl. Las condiciones para estas PCRs fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min; 35 ciclos compuestos por 95 °C durante 30 s, 54 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s; y extensión final a 72 °C durante 10 min.

El producto de esta reacción de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se aisló un fragmento de ADN de 369 pb. Una vez purificado, tanto el vector *pFGC5941* como este fragmento de ADN se digirieron con las enzimas de restricción *AscI* y *SwaI*. El producto de estas digestiones se aisló y ambos fragmentos de ADN se ligaron usando la ADN ligasa T7. Con el producto de esta ligación se transformó la cepa DH5α de *E. coli* y se seleccionaron, mediante análisis con enzimas de restricción y secuenciación, los clones que contenían la construcción con el fragmento del gen *PvAAH* insertado en sentido directo. A continuación, tanto esta construcción como el producto de PCR de 369 pb del gen *PvAAH* se digirieron con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI*. El

producto de estas digestiones se aisló y ambos fragmentos de ADN se ligaron. Con el plásmido resultante se transformó la cepa DH5 α de *E. coli* y se seleccionaron los clones positivos mediante análisis con enzimas de restricción y posterior secuenciación. De este modo, se generó una construcción en el vector *pFGC5941* que incorporaba un fragmento de 369 pb de la región 3' del gen *PvAAH* en sentido directo y en sentido reverso a cada lado de un intrón del gen de la chalcona sintasa A de petunia, que actúa como espaciador en este vector. Con esta construcción, así como con el vector *pFGC5941* vacío como control, se transformó la cepa k599 de *Agrobacterium rhizogenes*.

23.2. Transformación de plántulas de judía

Se llevó a cabo siguiendo básicamente el protocolo descrito por Estrada-Navarrete y col. (2007). Se emplearon semillas de la variedad Great Northern de *P. vulgaris*. Las semillas se esterilizaron mediante sucesivos lavados con etanol (30 segundos), hipoclorito sódico al 0,2% (v/v) (5 min) y, finalmente, seis lavados con agua destilada estéril. Tras la esterilización, las semillas se germinaron durante 72 horas a 26 °C sobre papel de filtro humedecido en placas de Petri. Una vez germinadas, se sembraron 1 o 2 semillas por maceta (7,5 cm de diámetro por 9 cm de altura) en vermiculita y se mantuvieron en una cámara con las condiciones de cultivo normales. Las plantas se regaron 3 veces por semana con solución B y D suplementada con KNO₃ 8 mM. Tras 3 días en estas condiciones, se inocularon las plantas con *A. rhizogenes*. La inoculación se hizo inyectando en la base de los cotiledones a cada planta entre 50 y 100 μ l de una solución densa de la cepa k599 de *A. rhizogenes* transformada con la construcción de silenciamiento *pFGC5941:PvAAH*, o con el vector *pFGC5941* vacío, usado como control. Para obtener el inóculo, la cepa k599 de *A. rhizogenes* se cultivó en medio LB sólido con los antibióticos adecuados durante 12 horas a 28 °C. Una vez obtenido un césped bacteriano, se vertieron 2 ml de agua desionizada estéril sobre dicho césped y se recogió la suspensión de células con

un asa de siembra. Una vez infectadas con la suspensión bacteriana, las plantas se transfirieron a una cámara de cultivo con una humedad relativa superior al 90% y se regaron cada dos días con la solución B y D suplementada con KNO₃ 8 mM. Una semana después de la infección comenzaron a aparecer las raíces pilosas en el lugar donde se había inyectado la suspensión de bacterias. Estas raíces pilosas exhibían un geotropismo alterado, así como un número inusualmente alto de ramificaciones. Las raíces pilosas se recogieron a las 3 o 4 semanas tras la infección, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Medio de cultivo para plantas B y D: la solución nutritiva descrita por Broughton y Dilworth (1971) estaba compuesta por 0,5 ml/l de solución A, B, C y D. Las soluciones A, B, C y D se esterilizaron por autoclave a 126 °C durante 20 min.

Solución A: CaCl₂ 2 M.

Solución B: KH₂PO₄ 1 M. Ajustar a pH 7.

Solución C: citrato férrico 120 mM. Mantener en oscuridad.

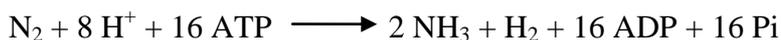
Solución D: MgSO₄ 0,5 M; K₂SO₄ 0,5 M; MnSO₄ 2 mM; H₃BO₃ 4 mM; ZnSO₄ 1 mM; CuSO₄ 4 mM; CoSO₄ 0,2 mM y Na₂MoO₄ 0,2 mM.

24. Determinación de peso seco

Para la determinación del peso seco, las muestras se pesaron inmediatamente después de su recolección y, a continuación, se incubaron durante 48 h a 70 °C. Trascurrido ese tiempo, en el que la muestra había perdido todo el agua que contenía, se volvieron a pesar para determinar su peso seco.

25. Determinación de la fijación de nitrógeno

La actividad de la enzima nitrogenasa se midió usando básicamente el método descrito por Witty y Minchin (1998). Este método se basa en la determinación del hidrógeno producido junto con la reducción del N₂ atmosférico a NH₃, de acuerdo a esta reacción:



La determinación de H_2 se llevó a cabo en un sistema de flujo abierto a 0,4 l/min, mediante un sensor electroquímico de hidrógeno (Qubit System). Para la determinación de la actividad nitrogenasa, las raíces noduladas de plantas individuales se cortaron y se transfirieron a un recipiente sellado de un volumen de 0,5 litros, donde se determinó la producción de hidrógeno. La actividad nitrogenasa aparente (ANT) se determinó en una mezcla de $N_2:O_2$ (80:20), mientras que la actividad nitrogenasa total se determinó en una mezcla de $Ar:O_2$ (79:21). Para la calibración del sensor de H_2 se usó hidrógeno de alta pureza. En cada uno de los experimentos la determinación se hizo en, al menos, 6 réplicas por tratamiento.

26. Determinaciones analíticas

26.1. Determinación de aminoácidos

Para la determinación de los aminoácidos individuales en el xilema de judía se usó el método descrito por Henderson y col. (2000), usando los reactivos y soluciones suministrados por la casa comercial Agilent.

En primer lugar, los aminoácidos presentes en las muestras de xilema se sometieron a derivatización con los reactivos OFA (o-ftaldialdehído) y FMOC (cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo). Para ello, a 0,5 μ l de muestra se añadieron 2,5 μ l de tampón borato 0,4 M (pH 10,2), la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y se añadieron 0,5 μ l del reactivo OFA. Se mezcló y se incubó 1 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 0,5 μ l del reactivo FMOC, se mezcló y se añadieron 32 μ l de agua miliQ estéril. Una vez derivatizados, los aminoácidos se separaron y cuantificaron mediante una cromatografía en fase reversa en una columna *Zorbax Eclipse AAA* (4,6 mm x 150 mm x 5 μ m), usando un equipo HPLC *Agilent 1100 series* (Agilent). La cromatografía se hizo a 40 °C con un flujo constante de 2 ml/min. Como fase móvil se usó un gradiente discontinuo del tampón A y de la solución B compuesto por:

Tiempo (min)	0	1,9	18,1	18,6	22,3	23,2	26
Tampón A (%):	100	100	43	0	0	100	100
Solución B (%):	0	0	57	100	100	0	0

Los OFA-aminoácidos se detectaron usando un diodo *array* a 338 nm y los Fmoc-aminoácidos midiendo a una λ de 262 nm. La identificación y cuantificación de los diferentes aminoácidos se estimó de acuerdo a los tiempos de retención y concentraciones de una curva de calibrado hecha con cada uno de los aminoácidos individuales (PN 5062-2478 y PN 5061-3334; Agilent).

Solución A: Na₂HPO₄ 40 mM (pH 7,8).

Solución B: acetonitrilo:metanol:agua miliQ (45:45:10, v/v/v).

26.2. Determinación de alantoína, alantoato, ureidoglicolato y glioxilato

El contenido de alantoína, alantoato, ureidoglicolato y glioxilato se determinó mediante el ensayo colorimétrico descrito por Vogels y van der 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.

Habitualmente el contenido de ureidos se determinó a partir de muestras vegetales congeladas y pulverizadas en nitrógeno líquido. Los extractos vegetales se obtuvieron tras añadir 4 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7,8; MnSO₄ 1 mM y DOC al 0,15%) por gramo de tejido y homogenizar suavemente con una varilla de vidrio. A continuación, esta mezcla homogénea se incubó durante 5-10 min en hielo, se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante, que se usó como extracto crudo.

Para la determinación de alantoína, la cantidad adecuada de extracto crudo se diluyó en agua desionizada fría hasta un volumen de 0,6 ml. A continuación, se añadieron 0,2 ml de NaOH 0,5 N y la mezcla se incubó a 100 °C durante 10 min, para transformar la alantoína en alantoato. Tras 5 min en hielo, se añadieron

0,2 ml de HCl 0,65 N y se incubó de nuevo a 100 °C durante 10 min, que transforma el alantoato en glioxilato y se aplicó la determinación de glioxilato.

Para la determinación de alantoato, la cantidad adecuada de extracto crudo se diluyó en agua desionizada fría hasta un volumen de 0,8 ml. A continuación, se añadieron 0,2 ml de HCl 0,15 N y la mezcla se incubó a 100 °C durante 10 min, para transformar la alantoato en glioxilato, y seguidamente se determinó el glioxilato formado.

Para la determinación del ureidoglicolato, la cantidad adecuada de extracto crudo se diluyó hasta un volumen de 0,8 ml en agua desionizada fría. A continuación, se añadieron 0,2 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), se mezcló y se incubó a 100 °C durante 10 min, para transformar el ureidoglicolato en glioxilato, y se aplicó la determinación de glioxilato.

Para la determinación de glioxilato, la cantidad adecuada de extracto crudo o muestra se diluyó en agua desionizada fría hasta un volumen de 1 ml. A continuación, a la mezcla se añadieron 0,2 ml de tampón fosfato 0,4 M (pH 7) y 0,2 ml de fenilhidrazina-HCl 23,1 mM. Tras 10 min a temperatura ambiente, se añadieron 1 ml de HCl 12 M y 0,2 ml de ferricianuro potásico 48,6 mM. Después de 15 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 520 nm.

La concentración de alantoína, alantoato, ureidoglicolato y glioxilato se estimó de acuerdo con una curva patrón obtenida tras la transformación de cantidades conocidas de alantoína a glioxilato. Para el cálculo del contenido en alantoína, a la A_{520} obtenida para este compuesto se resta la medida para el alantoato y el glioxilato para esa muestra. Del mismo modo, para determinar la concentración de alantoato y ureidoglicolato, a la A_{520} obtenida para cada uno de ellos se restó la obtenida para el glioxilato. El coeficiente de extinción obtenido para el difenilformazán del glioxilato en estas determinaciones fue de $42 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

26.3. Determinación de amonio y urea

La concentración de amonio se midió mediante el método descrito por Witte y Medina-Escobar (2001) con algunas modificaciones. La muestra (habitualmente 100 μ l) se diluyó en agua desionizada hasta un volumen de 0,4 ml. A esta mezcla se le añadieron 0,1 ml de solución de fenol-nitroprusiato y 0,2 ml de solución de hipoclorito. Tras añadir la solución de hipoclorito, los tubos se cerraron inmediatamente para evitar la pérdida de amonio. A continuación, se mezcló por inversión y se incubó a 50 °C durante 20 min. Transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia a 639 nm. El coeficiente de extinción obtenido con este método, usando cloruro de amonio como patrón, fue de 14,2 mM⁻¹. cm⁻¹.

La determinación de urea se hizo de forma indirecta, tras su conversión a amonio, después de incubar la muestra con ureasa de *Canavalia ensiformis* tipo III (U1500, Sigma). Para ello, a 0,3 ml de agua desionizada se le añadieron 0,1 ml de muestra y 10 μ l de ureasa (1 U/ μ l). A continuación, se mezcló por inversión y se incubó a 37 °C durante 10 min. Seguidamente, se llevó a cabo la determinación de amonio como se ha descrito anteriormente. En todos los casos se usó urea como control interno para comprobar que, tras la incubación con ureasa, el 100% de la urea se transformaba en amonio.

Solución de fenol-nitroprusiato: se disolvieron 34 mg de nitroprusiato sódico en 70 ml de agua desionizada, se añadieron 7 g de fenol y se ajustó el volumen a 100 ml. La solución se guardó en oscuridad a 4 °C.

Solución de hipoclorito: se disolvieron 2,96 g de NaOH y 29,74 g de Na₂HPO₄.12H₂O en 140 ml de agua desionizada. Una vez disuelto el fosfato, se añadieron 16,6 ml de una solución de NaOCl al 12%. El pH de la solución se ajustó a 12 con NaOH y el volumen a 200 ml con agua desionizada. Esta solución se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente. Las soluciones almacenadas se usaron siempre en un plazo menor de 30 días.

26.4. Determinación de carbohidratos

El contenido en azúcares solubles (glucosa, fructosa, sacarosa) y almidón se determinó a partir de material vegetal congelado y pulverizado con nitrógeno

líquido, usando el protocolo descrito por Stitt y col. (1989) con algunas modificaciones.

26.4.1. Extracción de carbohidratos

La extracción de carbohidratos se llevó a cabo mediante sucesivos lavados con etanol. Para ello, a 100 mg de material vegetal se le añadió 1 ml de una solución acuosa de etanol al 80% tamponada en HEPES–KOH 5 mM (pH 7,5), se mezcló por agitación con un vórtex y se incubó a 80 °C durante 30 min. A continuación, se centrifugó a 14.000 g durante 5 min y se recogió el sobrenadante. Esta extracción se repitió 2 veces con la misma solución y otras dos veces más con una solución acuosa de etanol al 50% tamponada en HEPES–KOH 5 mM (pH 7,5). Finalmente, al precipitado obtenido se le añadió 1 ml de agua desionizada, se mezcló y se incubó a 80 °C durante 30 min. Tras esta incubación, se centrifugó a 14.000 g durante 5 min y se recogió el sobrenadante. Por último, el sobrenadante obtenido en cada uno de las extracciones se mezcló en un mismo tubo y se almacenó a -20 °C hasta la determinación del contenido en azúcares solubles.

26.4.2. Determinación de azúcares solubles

El contenido en azúcares solubles de los extractos etanólicos se determinó espectrofotométricamente siguiendo la reducción del NADP⁺ como describen Stitt y col. (1989). En una cubeta espectrofotométrica de cuarzo se mezclaron 50 µl de extracto etanólico con 750 µl de una solución que contenía: imidazol-HCl 90 mM (pH 6,9); MgCl₂ 2,8 mM; NADP⁺ 0,5 mM; ATP 1,4 mM y 0,4 U de glucosa-6-P deshidrogenasa (G7877, Sigma). A continuación, se mezcló por inversión y se midió su absorbancia a 339 nm (A0). Tras 5 min a temperatura ambiente, a esta mezcla se le añadieron 2 µl de hexoquinasa (0,4 U/µl; H5000, Sigma) y, tras 15 min a temperatura ambiente, se midió de nuevo su absorbancia (A1). Seguidamente, se añadieron 2 µl de fosfoglucosa isomerasa (0,8 U/µl;

P5381, Sigma), se incubó a temperatura ambiente otros 15 min y se midió la absorbancia (A2). Por último, se añadieron 2 μl de invertasa (80 U/ μl ; I4504, Sigma), se incubó a temperatura ambiente otros 15 min y se midió la absorbancia (A3).

El contenido en glucosa, fructosa y sacarosa se calculó de acuerdo al incremento de absorbancia entre los tiempos A0 y A1, A1 y A2 y entre A2 y A3, respectivamente, teniendo en cuenta que la relación estequiométrica entre el NADP⁺ reducido y la glucosa y fructosa es de 1:1, mientras que en el caso de la sacarosa es de 2:1. El método se validó empleando cantidades conocidas de glucosa, fructosa y sacarosa. Se empleó un coeficiente extinción para el NADPH de $6,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

26.4.3. Determinación de almidón

Para la determinación de almidón, al precipitado obtenido tras la extracción etanólica de los azúcares solubles se le añadió 1 ml de agua desionizada, se mezcló por agitación en vórtex y, tras 5 horas a 100 °C, se centrifugó a 14.000 g durante 5 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. Una vez solubilizado, el almidón presente en la muestra se hidrolizó enzimáticamente hasta glucosa. Para ello, 50 μl del sobrenadante antes obtenido se mezclaron con 450 μl de una solución que contenía: acetato sódico 80 mM (pH 4,8); 1,4 U de amiloglucosidasa (A1602, Sigma); 2 U de α -amilasa (A6255, Sigma). Esta mezcla se incubó durante 12 horas a 37 °C. Se centrifugó durante 5 min a 14.000 g y se recogió el sobrenadante. El contenido en glucosa se determinó usando 50 μl del sobrenadante anterior, como se indica en el apartado anterior.

26.5. Determinación de clorofilas

El contenido en clorofilas se determinó mediante el método descrito por Lichtenthaler (1987), usando material vegetal congelado y pulverizado con nitrógeno líquido. La extracción de clorofilas se realizó mediante lavados

sucesivos con acetona al 80% (v/v), como se describe a continuación. A 0,09 gramos de material vegetal se le añadieron 1,5 ml de una solución acuosa de acetona al 80%, se mezcló por agitación en vórtex, se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 3.000 g y se recogió el sobrenadante. La extracción con acetona al 80% se repitió tres veces más. Habitualmente, tras estas cuatro extracciones con acetona el precipitado tenía un color blanco, indicando que la extracción de los pigmentos era completa. Por último, el sobrenadante obtenido en cada uno de las extracciones se mezcló en un mismo tubo y se midió su absorbancia a 663 y 645 nm. La concentración de clorofila a y b se determinó mediante las siguientes fórmulas algebraicas: Clorofila a ($\mu\text{g/ml}$)= $12,25A_{663} - 2,79A_{646}$; Clorofila b ($\mu\text{g/ml}$)= $21,5A_{646} - 5,1A_{663}$.

26.6. *Determinación de nitrato*

Para la determinación de nitrato en las muestras de xilema se usó el método descrito por Cataldo y col. (1975) con algunas modificaciones. Se mezclaron 50 μl de xilema con 200 μl de una solución de ácido salicílico al 5% (disuelto en H_2SO_4 concentrado), se mezcló por agitación y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 4,75 ml de NaOH 2 N, se mezcló por agitación y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia a 410 nm. Con este método y utilizando nitrato potásico como patrón se obtuvo un coeficiente de absorción de $10 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

26.7. *Determinación de proteína*

Rutinariamente, la concentración de proteína se determinó usando el reactivo de Bradford (1976) (Bio-rad). Además, para determinar la concentración de la proteína PvAAH-HA-Strep pura se usó el kit comercial *QuantiPro BCA Assay* (Sigma). En ambos casos se usó seroalbúmina bovina como patrón.

27. Determinación de actividades enzimáticas

Para la determinación de todas las actividades enzimáticas se usaron extractos provenientes de muestras vegetales congeladas y pulverizadas con nitrógeno líquido. La extracción y manipulación de los extractos se hizo siempre a temperaturas entre 0 y 4 °C.

En todos los casos, se incluyeron los controles pertinentes para determinar la liberación no enzimática del producto de la reacción. Asimismo, para estimar las posibles interferencias producidas por los diferentes tampones, cationes divalentes e inhibidores usados en este trabajo, en todas las determinaciones se incluyeron los correspondientes controles.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μmol de sustrato por min. Los resultados de actividad enzimática se muestran normalmente como actividad específica (mU/mg, mU por miligramo de proteína).

27.1. Determinación de la actividad alantoinasa

Para la determinación de la actividad alantoinasa se siguió el protocolo descrito por Raso y col. (2007b). Este método se basa en la determinación de la formación de alantoato mediante el método descrito por Vogels y van der Drift (1970). Los extractos vegetales usados se obtuvieron tras añadir 4 ml de tampón de extracción por gramo de tejido y homogeneizar suavemente con una varilla de vidrio. Esta suspensión se incubó entre 5 y 10 min en hielo, se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido se usó como extracto crudo. La mezcla de reacción consistió en: Tris-HCl 50 mM (pH 7,8); MnSO_4 1 mM; alantoína 12 mM y extracto crudo. Habitualmente, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1,6 ml y usando 50 μl de extracto crudo.

La reacción se inició por adición del sustrato y se llevó a cabo a 35 °C. A distintos tiempos, el alantoato se midió tomando 0,2 ml de la mezcla de reacción que se mezclaron con 0,2 ml de HCl 0,15 N y 0,6 ml de agua desionizada fría.

Tras incubar a 100 °C durante 10 min, se midió el glioxilato como se describe en el apartado 26.2.

Tampón de extracción: Tris-HCl 50 mM pH 7,8; MnSO₄ 1 mM y DOC al 0,15%.

27.2. Determinación de la actividad catalizadora de la degradación del alantoato

Para la determinación de la actividad que cataliza la degradación del alantoato se utilizaron dos métodos distintos, uno el método descrito por Raso y col. (2007a) (dependiente de fenilhidrazina; PH-alcasa) y el otro una modificación del método descrito por Werner y col. (2008) (independiente de fenilhidrazina; AAH).

27.2.1. Determinación de la actividad catalizadora de la degradación del alantoato dependiente de fenilhidrazina (PH-alcasa)

Este método se basa en la cuantificación del ureidoglicolato formado en la reacción, tras su conversión química en glioxilato. La determinación de glioxilato se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Romanov y col. (1999). Los extractos vegetales usados se obtuvieron tras añadir 4 ml de tampón de extracción por gramo de tejido y homogeneizar con una varilla de vidrio; la mezcla resultante se incubó entre 5 y 10 min en hielo, se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante obtenido se usó como extracto crudo. La mezcla de reacción consistió en: Tea-NaOH 50 mM (pH 7); MnSO₄ 1 mM; alantoato potásico 12 mM; fenilhidrazina-HCl 0,7 mM y extracto crudo. Normalmente se utilizó 0,2 ml de extracto crudo en un volumen de reacción de 2 ml.

La reacción se inició al añadir el sustrato y se llevó a cabo a 35 °C. A diferentes tiempos se tomaron 0,3 ml de la mezcla de reacción, que se mezclaron con 0,2 ml de Tea-NaOH 150 mM (pH 7,8) frío. La mezcla se incubó durante 10 min a 100 °C para la transformación del ureidoglicolato en glioxilato. Tras 5 min en hielo, se añadieron 0,1 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina 5 mM (disuelto en HCl 2 N) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación se

añadieron 1,4 ml de tampón fosfato sódico 0,6 M (pH 12) y tras 20 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia de la solución a 450 nm. El coeficiente de absorción obtenido con este método fue de $14 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Tampón de extracción: Tea-NaOH 50 mM pH 7; MnSO_4 1 mM y DOC al 0,15%.

27.2.2. *Determinación de la actividad catalizadora de la degradación del alantoato independiente de fenilhidrazina (AAH)*

Este método se basa en la determinación del amonio producido en la reacción como describe Witte y Medina-Escobar (2001).

Para la determinación de esta actividad en judía se usaron muestras de material vegetal congelado y pulverizado con nitrógeno líquido. Los extractos vegetales usados se obtuvieron tras añadir 2 ml de tampón de extracción por gramo de tejido y homogeneizar suavemente con una varilla de vidrio. Este extracto se incubó entre 5 y 10 min en hielo, se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. A continuación, el sobrenadante obtenido se dializó en tampón de lavado. Para la diálisis, 180 μl del sobrenadante se filtraron a través de una columna *SpinTrap G25* (GE Healthcare), previamente equilibrada con tampón de lavado, que se centrifugó a 700 g durante 1 min. El eluido se usó como extracto crudo.

La reacción enzimática se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C en una mezcla compuesta por 500 μl de solución de alantoato, 10 μl de proteína pura o 100 μl de extracto crudo de judía y tampón de lavado hasta un volumen final de 1 ml. La reacción comenzó tras añadir la enzima pura o el extracto crudo a la mezcla de reacción. A distintos tiempos se cogieron partes alícuotas de 100 μl de la mezcla reacción para la determinación de amonio o urea (Materiales y Métodos, apartado 26.3)

Para estudiar la estequiometría de esta reacción, además de determinar el amonio producido se midió la producción de ureidoglicina. Dado que la ureidoglicina se descompone espontáneamente a ureidoglicolato y amonio y/o

glioxilato, amonio y urea, las muestras se calentaron a 100 °C durante 10 min para transformar toda la ureidoglicina a glioxilato y de este modo poder determinarla. Para estas determinaciones se tomaron simultáneamente partes alícuotas de la mezcla reacción de 100 µl para la determinación de amonio o urea y otras de 400 µl para la determinación de glioxilato (Materiales y Métodos, apartado 26.2).

Se observó que una disminución en la concentración de DTT de 15 a 2 mM en el tampón de extracción producía un descenso de más del 80% en la actividad AAH.

Excepto para la determinación de urea, en los ensayos de actividad AAH en extractos crudos de judía se incluyó el inhibidor de ureasa PPD (fenilfosfordiamidato) en los tampones de extracción y lavado, a una concentración final de 100 y 50 µM, respectivamente.

Tampón de extracción: Tea-NaOH 100 mM (pH 8); NaCl 150 mM; DTT 15 mM; MnCl₂ 1 mM y Triton X-100 al 0,5%.

Tampón de lavado: Tea-NaOH 100 mM (pH 8); NaCl 150 mM; DTT 2 mM; MnCl₂ 2 mM y Triton X-100 al 0,005%.

Solución de alantoato: Tea-NaOH 10 mM (pH 8) y alantoato potásico 6 mM.

27.3. Determinación de la actividad uricasa

Para la determinación de la actividad uricasa se usó el método descrito por Pineda y col. (1984). Este método se basa en la determinación espectrofotométrica de la desaparición de urato debido a su oxidación en condiciones aeróbicas.

Los extractos vegetales usados se obtuvieron tras añadir 4 ml de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,5) por gramo de tejido y homogeneizar con una varilla de vidrio. Este extracto se incubó entre 5 y 10 min en hielo, se centrifugó a 14.000 g durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante, que se usó como extracto crudo.

La reacción enzimática se llevó a cabo en una mezcla compuesta por: Tris-HCl 100 mM (pH 8,5), ácido úrico 100 mM y extracto crudo. Normalmente, se usaron 0,1 ml de extracto crudo en 1 ml de volumen final de reacción.

La reacción se inició por adición del sustrato y se incubó a 30 °C en condiciones aeróbicas. En esta reacción, la desaparición del ácido úrico se determinó de forma directa midiendo la absorbancia a 292 nm. El coeficiente de extinción molar para el urato es de $12.200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

28. Determinación de las características bioquímicas de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep

Para la caracterización bioquímica de la enzima recombinante PvAAH-HA-Strep se determinó el incremento de la concentración de amonio a lo largo del tiempo, en presencia de la proteína PvAAH-HA-Strep pura y 3 mM de alantoato como sustrato, usando el método descrito en el apartado 27.2.2 de Materiales y Métodos, con las modificaciones que a continuación se indican. Salvo que se indique lo contrario, la proteína PvAAH-HA-Strep usada en estos ensayos se purificó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 22.3 de Materiales y Métodos.

28.1. Determinación del pH óptimo de ensayo

Se usó el método antes descrito salvo que el tampón de lavado y la solución de alantoato eran soluciones de fosfato ajustadas a diferentes pH entre 4 y 12.

28.2. Determinación de la temperatura óptima de ensayo

Se siguió el protocolo estándar tanto en la purificación de la proteína PvAAH-HA-Strep como en las posteriores determinaciones de actividad enzimática, excepto que en estos ensayos se usaron diferentes temperaturas de reacción. En estas determinaciones, el tiempo máximo de reacción fue de 20 min.

28.3. *Efecto de diferentes iones metálicos y del EDTA sobre la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep*

Para estas determinaciones, la proteína PvAAH-HA-Strep se purificó en ausencia de manganeso en los tampones. Posteriormente, se incubó durante 15 min a 4 °C con el compuesto indicado y se determinó su actividad en ausencia de manganeso en la mezcla de reacción. Como control se usó el valor de actividad enzimática de la proteína pura, tratada como antes se indica, pero incubada durante 15 min a 4 °C sin ninguno de estos compuestos.

28.4. *Determinación de las constantes cinéticas*

Para la estimación de la K_m , se determinó la velocidad inicial (máximo 10 min) de la reacción catalizada por la proteína PvAAH-HA-Strep pura usando concentraciones variables de sustrato entre 0,05 y 1 mM.

28.5. *Efecto del glioxilato sobre la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep*

Para determinar el efecto del glioxilato, la proteína PvAAH-HA-Strep pura se dializó mediante una columna *SpinTrap G25* (GE Healthcare), previamente equilibrada con tampón de lavado sin DTT. Una vez eliminado el DTT, la proteína se incubó durante 15 min a 4 °C en presencia de 1 o 2,5 mM de glioxilato. Tras la incubación, la proteína se dializó de nuevo en tampón de lavado sin DTT mediante una columna *SpinTrap G25* (GE Healthcare), para eliminar el glioxilato, y se determinó su actividad en ausencia de DTT en la mezcla de reacción. Como control se usó el valor de actividad enzimática de la proteína pura, tratada como antes se indica, pero incubada durante 15 min a 4 °C en ausencia de glioxilato.

IV. RESULTADOS

1. Identificación y clonación del gen que codifica la enzima alantoato amidohidrolasa de *Phaseolus vulgaris*

1.1. Identificación y clonación del ADNc *PvAAH*

El objetivo de este trabajo ha sido el análisis de la degradación del alantoato en plantas de judía. Como primera aproximación a este objetivo se llevó a cabo la búsqueda e identificación de la secuencia del gen o genes que codifican las enzimas responsables de la degradación del alantoato en judía. Al inicio de este trabajo, la única secuencia conocida de una enzima de plantas capaz de catalizar la degradación del alantoato era la alantoato amidohidrolasa (AAH) de *Arabidopsis thaliana* (*AtAAH*, Todd y Polacco, 2006). Por tanto, en primer lugar, se buscaron aquellas secuencias de judía disponibles en la base de datos del NCBI que presentaran homología con la AAH de *Arabidopsis*. De este modo, se identificó un EST de judía (CV539783) que presentaba un 73% de homología con la secuencia de la *AtAAH*. A partir de esta secuencia, se diseñaron oligonucleótidos que se usaron para amplificar los fragmentos 5' y 3' del ADNc *PvAAH*, mediante el método RACE-PCR. Estos fragmentos de ADNc se clonaron en el vector *pGEMT-Easy* y se determinaron sus secuencias. La secuencia completa del ADNc *PvAAH* se obtuvo a partir del solapamiento de las secuencias de los fragmentos 5' y 3'. A continuación, se diseñaron oligonucleótidos complementarios a los extremos 5'- y 3'- de la secuencia deducida, que se emplearon para amplificar por PCR el ADNc completo del gen *PvAAH*.

El fragmento de ADN que se obtuvo tenía un tamaño de 1.591 pb y contenía un marco de lectura (ORF) de 1.452 pb, comprendido entre los codones de inicio (ATG) y final de lectura (TGA) del gen *PvAAH*, situados en las posiciones 117 y 1.566 del fragmento clonado. Este ORF da lugar a una proteína de 483 aminoácidos (Figura 2), con una masa molecular de 52,4 kDa, un punto isoeléctrico de 5,2 y una carga neta a pH 7 de -16. Esta proteína, al igual que otras AAHs descritas (Todd y Polacco, 2006; Agarwal *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2008), se puede clasificar dentro de la familia de las peptidasas M20.

```

gagattgggaagcattgggtgcctagctaagctaaagctaaacccttc 47
agtttttagcttagcttcttctgcttttgccttctccaaccataaacagccgccaccaccaccaccacc 116
ATGtcttacaccaccaccaccaccaccacttctcttcactcttgcttccttctcttctgctcctctca 185
M S Y T T T T T T T S L H S C F L L F C L L S
gctctttcatgtgtttccatgTtctctgggtattgagacaggagatttagaaaaagagatgatttgttt 254
A L S C V S M F S G I E T G D L E K R D D L F
ccacagattctaaggacgagggcagtgggcagggctttagacttgggaaggtgagtgaggcaaggt 323
P Q I L R D E A V A R L Y E L G K V S D G K G
tatttgagaggacattcttgagctctgcacatccatgagggaattattcttattcgtaaatggatggag 392
Y L E R T F L S P A S M R A I I L I R K W M E
gatgctgggttgagaacttgggtggaccaaatgggaaatgtccatggctcgagtcgatggtgcaaacgca 461
D A G L R T W V D Q M G N V H G R V D G A N A
aatgctgaagctttattgattggttctcacatggacactgttgggtgatgctgggatgttgatggatcc 530
N A E A L L I G S H M D T V V D A G M F D G S
ctaggaatagtctctgcaatatctgccttgaaggccatgcaatttcaatggaaaactggaaaagctaaag 599
L G I V S A I S A L K A M H F N G K L E K L K
cgccccgttgaggtgattgcatattagtgatgaagaggggtgctcagatttcaaactacgttcttgggcagt 668
R P V E V I A F S D E E G V R F Q T T F L G S
ggtgtattgctggtattttgctgggtacaacattggagatatctgataagagggatgtaatgataaaa 737
G A I A G I L P G T T L E I S D K R D V M I K
gattttcttaaggagaactcaattgacatcacagaggaaagtcttttaagctcaagtatgacccaaaa 806
D F L K E N S I D I T E E S L L K L K Y D P K
tccgtttgggggttatggtgaggttcacattgagcagggctcctgtgctagaacaagtcggtttcccactt 876
S V W G Y V E V H I E Q G P V L E Q V G F P L
ggtgtgggttaaaggcatagctgggcagacacgattgaaggttacagtttagaggatcacaaggccatgct 944
G V V K G I A G Q T R L K V T V R G S Q G H A
ggaacagtgccaatgtccatgctgcgccaagatccaatggcagctgctgcagaacaaattgtagtcttgaa 1013
G T V P M S M R Q D P M A A A A E Q I V V L E
agcctctgtaaacatcctgaagaattcctttcttatgatgctcattgcagtgattcaacagtgaaatca 1082
S L C K H P E E F L S Y D A H C S D S T V K S
ctgtcaagctcacttgtctgtactgttggagagatatcaacatggccaagtgccagtaatgtcattcca 1151
L S S S L V C T V G E I S T W P S A S N V IP
ggccaggttacatataccgtggacattcgagcaattgatgaccttggacgtgagtgatttatctatgat 1220
G Q V T Y T V D I R A I D D L G R E A V I Y D
ttatcaaaacaaatttaccaaatatgtgacaagcgttcagtatcctgcattattgaacacaagcatgat 1289
L S K Q I Y Q I C D K R S V S C I I E H K H D
gcaggtgctgtgatttgtgattctgatctgagttctcagctcaagctgcaacttattctgcactaaag 1358
A G A V I C D S D L S S Q L K S A T Y S A L K
aagatggaggggtgacattcaggatgaagtgccaacattgatgagtgagcagggccatgatgcaatggca 1427
K M E G D I Q D E V P T L M S G A G H D A M A
atatcccacttaacaaaggtgggaatgctgtttgtgctgagtgctgaggagcatcagtcactctccacaa 1496
I S H L T K V G M L F V R C R G G I S H S P Q
gagcatgtgctagataatgatgtctgggcagctggttagcaaccttgcatttctggaaaatctatca 1565
E H V L D N D V W A A G L A T L S F L E N L S
TGAgtgatatgataactgtgtaaagc 1591

```

*

Figura 2. Secuencia de nucleótidos del ADNc y secuencia deducida de aminoácidos de la alantoato amidohidrolasa de judía PvAAH La secuencia de nucleótidos del ADNc *PvAAH* se muestra en minúscula y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de este ADNc se muestra en mayúscula. El codón de inicio y final de lectura se muestran en negrita y mayúscula.

La secuencia de aminoácidos deducida a partir del ADNc *PvAAH* presentó un alto grado de homología con las AAHs identificadas en plantas (95,4% y 70,2% de identidad con las AAHs de *A. thaliana* y *Glycine max*, respectivamente) y un

grado de homología menor con las AAHs descritas en bacterias (31,2% y 32% de identidad con las AAHs de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, respectivamente). Además de las AAHs de *A. thaliana* y *G. max*, se encontraron proteínas similares a PvAAH en todas las especies de plantas cuyos genomas están disponibles en la base de datos *Phytozome* (<http://www.phytozome.net>) (Figura 3).

El alineamiento de las secuencias de la proteína PvAAH y las de las AAHs de soja y *Arabidopsis* (Werner *et al.*, 2008) y *E. coli* (Agarwal *et al.*, 2007) permitió observar que estaban conservados los aminoácidos necesarios para la unión del sustrato (Thr₂₇₈, Asn₃₄₂, Arg₃₅₅ y His₄₅₇), cofactores (His₁₂₅, Asp₁₃₆, Glu₁₇₃, His₂₃₉ y His₄₅₇) e iones metálicos (Gly₂₆₂, Arg₂₆₅ y Arg₃₅₅), así como un dominio de homodimerización (Ala₂₆₁-Val₃₄₂) (Figura 4).

Asimismo, en el extremo N-terminal de la proteína PvAAH se identificó un posible péptido de señalización hacia la ruta secretora y que está presente también en las otras AAHs de plantas (AtAAH y GmAAH) (Figura 4), así como varias secuencias que podrían ser dianas de modificación post-traduccional por fosforilación.

1.2. Determinación del número de copias del gen *PvAAH* en el genoma de judía

El número de copias del gen *PvAAH* en el genoma de *P. vulgaris* se determinó mediante análisis por Southern blot. Como se muestra en la figura 5, la hibridación con un fragmento de 599 pb de la región 3' del ADNc *PvAAH* usado como sonda dio como resultado la aparición de una única banda en las digestiones simples y de dos bandas en la digestión doble, lo que indicaba que el gen *PvAAH* es de copia única (Figura 6).

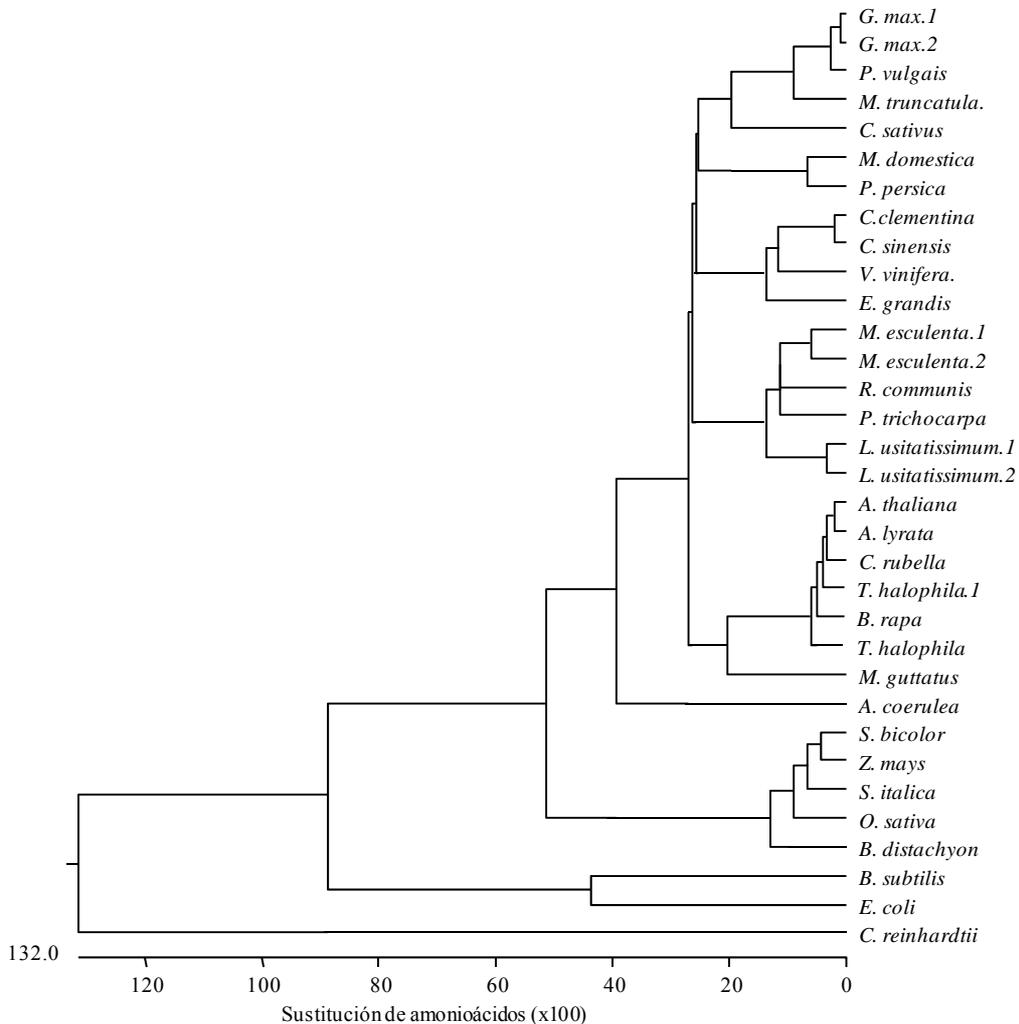


Figura 3. Distancias filogenéticas entre diferentes AAHs de plantas, algas y bacterias El cladograma se construyó usando el método Clustal W del programa informático MegAlign (DNASTAR). En este cladograma se incluyen las secuencias de aminoácidos de las AAHs descritas en *Escherichia coli* (NP_286265), *Bacillus subtilis* (NP_391133), *Arabidopsis thaliana* (NM_118126) y *Glycine max* (*G. max.1* , Glyma15g16870; *G. max.2*, Glyma09g05600); así como las secuencias de posibles alantoato amidohidrolasas de plantas y algas: *Phaseolus vulgaris* (EF650088.2), *Aquilegia coerulea* (Aqua_030_00308.1), *Arabidopsis lyrata* (914645), *Brachypodium distachyon* (Bradi1g31890.1), *Brassica rapa* (Bra012519), *Capsella rubella* (Carubv10004553m), *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001690684) *Citrus clementina* (clementine0.9_009279m), *Citrus sinensis* (orange1.1g_015341m), *Cucumis sativus* (Cucsa.134540.1), *Eucalyptus grandis* (Eucgr. D00017.1), *Linum usitatissimum* (*L. usitatissimum.1*, Lus10038372; *L. usitatissimum.2*, Lus10036233), *Medicago truncatula* (Medtr4g090150), *Malus domestica* (MDP0000168289), *Manihot esculenta* (*M. esculenta.1*, cassava4.1_029922m; *M. esculenta.2*, cassava4.1_016502m), *Mimulus guttatus* (mgv1a005319m), *Oryza sativa* (LOC_Os06g45480), *Populus trichocarpa* (POPTR_0001s_16010.1), *Prunus persica* (ppa005027m), *Ricinus communis* (27942.m000154), *Setaria italica* (Si006219m), *Sorghum bicolor* (Sb10g026590.1), *Thellungiella halophila* (*T. halophila.2*, Thhalv10024702m; *T. halophila*, Thhalv10025370m), *Vitis vinifera* (GSVIVT01012140001) y *Zea mays* (AY104710).

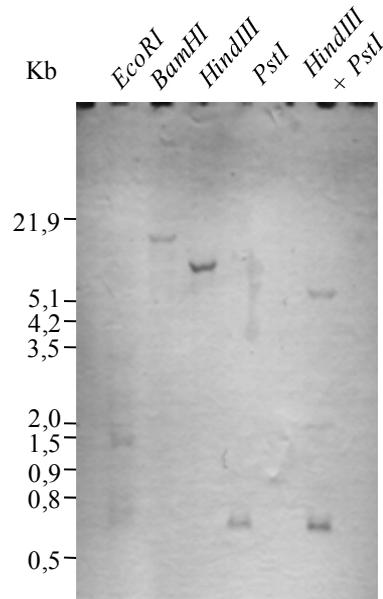


Figura 5. Análisis por Southern blot del gen *PvAAH*. El ADN genómico de *P. vulgaris* fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI* y *HindIII + PstI* e hibridado con un fragmento de 599 pb de la región 3' del ADNc *PvAAH*. En el margen izquierdo se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

1.3. Estructura del gen *PvAAH* en el genómica de judía

Para determinar la organización de intrones y exones del gen *PvAAH*, usando ADN genómico de judía como molde, se amplificó por PCR un fragmento de ADN genómico que contenía la secuencia completa del ADNc *PvAAH*. El producto de esta PCR se clonó y se determinó su secuencia. El alineamiento de esta secuencia con la del ADNc del gen *PvAAH* mostró que este gen tiene un tamaño de 4.335 pb (desde el codón de inicio hasta el de final de lectura) y está estructurado en 11 intrones y 12 exones, situados en las posiciones: 1 - 100, 1.022 - 1.114, 1.378 - 1.471, 1.543 - 1.628, 1.716 - 1.833, 2.020 - 2.128, 2.206 - 2.312, 2.415 - 2.501, 2.956 - 3.198, 3.316 - 3.439, 3.968 - 4.132 y 4.217 - 4.335, respecto al comienzo de la transcripción (Figura 6).

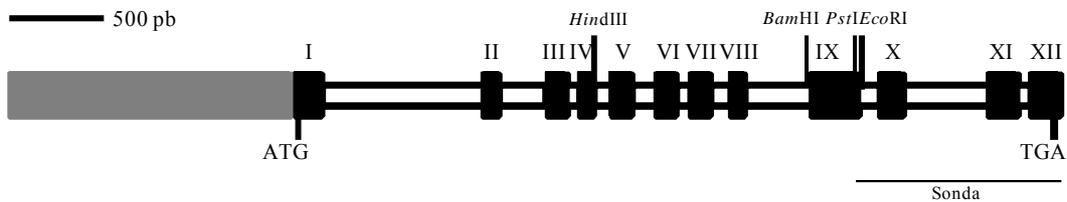


Figura 6. Estructura del gen *PvAAH* en el genoma de judía. En negro se representan los exones, en blanco los intrones y en gris la región promotora. En la parte superior con números romanos se indica el número de exones y con barras verticales el punto de corte de las enzimas de restricción usadas para el análisis por Southern blot. En la parte inferior se indican los codones de inicio y final de lectura y con una línea horizontal se señala la región de hibridación de la sonda usada para el análisis por Southern blot.

1.4. Análisis de la región promotora del gen *PvAAH*

Para estudiar la regulación de la transcripción del gen *PvAAH* se identificó y clonó un fragmento que contenía al menos la región promotora proximal del gen. Se usó el kit *GenomeWalker* y varios oligonucleótidos, complementarios a la secuencia 5' no codificante del ADNc *PvAAH*, con los que se amplificó un fragmento de 1.206 pb del ADN genómico que precede a la secuencia codificante del gen *PvAAH*. Una vez aislado este fragmento de la región promotora del gen *PvAAH*, se clonó en el vector *pGEMT-Easy* y se determinó su secuencia.

El análisis de la región promotora del gen *PvAAH* con los programas informáticos TSSP-TCM, PlantCare y PLACE dio como resultado la identificación de varios motivos de posible regulación de la transcripción (Figura 7). Se localizó una caja TATA (TATA box) situada en la posición -66. También se localizaron posibles motivos de regulación de la transcripción en respuesta al ácido abscísico (ABRE) en la posición -145, por giberelinas (GARE motif) en la posición -513, así como por déficit hídrico (MBS) en las posiciones -638 y -854. Los motivos correspondientes a las posiciones -309 (G-box), -613 (TCT-motif), -721 (Box 4), -780 (Box 4), -796 (Box 4), -957 (GT1-motif), -1.138 (Box 4) y -1.151 (GAG-motif) se identificaron como secuencias de regulación por luz. En las posiciones -48 y -351 se encontraron dos motivos de regulación por baja temperatura (LTR) y en la posición -345, -416 y -473 varios motivos de regulación

en respuesta a choque térmico. Dentro de esta secuencia también se localizaron diversos motivos de regulación de la transcripción por estrés biótico, en las posiciones -567 (TC rich repeats), -922 (WUN-motif) y -1.099 (W box).

ATCAAATAAGTACTTTTGTGTAAAGAGTGTATAATGAAAACCTGATTAAAGTGTTCATCTCTCTAAAGAAAT
 Box 4 GAG-motif
TAATTTATAGTGTTTAATTATGAACCTTTCCTGTAA**TTGACC**GAATTAGTGTTTGCTGATTTCTAGCATG
 ATCCCTGGTTCATAAGAAGATATTTTGGTATATTTGGATAATGCTAGAATATCTGTAATGAGTTAATATC
W box
 TTTTACTAAATCATTGTTAGTTGATTTCTCGAGAGGTT**TTAACC**GAATTTGATGAGATATGATCACCATT
GT1-motif
 CAC**AGGAAATTTT**CATATTTATTTATTTGTTGTCATTTATTTAGCATCTTTAATGCATATCAATGTGGTCGG
WUN-motif
 TCGGT**CACCGAAA**CTATGTGAATGGCTTGTACAATACCAACCGGTATATATTTAAATTA**ATCTTT**AATTA
MBS LTR Box 4
 Box 4 Box 4
 AAT**TAATAT**GAATTTTATTTATTTTAAAAAT**TAATAAATTAAT**TTATAAAATCATTTTTTTCTTATAGTGT
 TAATCTTAAATTTTTTGTTTTATTTTTTTACAAAAATAAACTCATTTTTTAACTTTGGTATGTCATACTTTTTT
MBS TCT-motif
 TTTCCAT**CAGTTG**CTTTTATTTAACTTTTAGAAG**GTAAGA**AGTCATTTTCAGGATTAAGAACATAACCTTATT
TC rich repeats GARE motif
 CATTTATT**ATTTTCTAAC**TTTGATATAGATTATACTAAAAATAGGAAATGTGTTTTTTAAGGAA**AAACAGAA**
HSR
 AATGTATTAGAATGTATGATCTTATACTAAGT**AGAAAATGCG**TTAGGATATGAATGACTCCTTGGAATTA
HSR
 AAAACCTTTTCCAAAATAG**AAAATTTGTT**AAAAATTTAAGTAGTCTTATTAGTTTTAAATCAGAATGATCAA
LTR HSR
 TTCAAGAAATATAAA**CCGAAAAAATTTAA**TGTGTATAGATTTTACATCCAACACAATTTTCATTGAAACAAA
 ATCATCAAACCAAAAGTAATAAAAATACATTATTTCACTTATTTTAAATGATAATTTATGTATATATTTTTTAA
G-box
 AATAAAAAATTATATTTTATTTATATAACCTATGAAGTTCGAA**CAGTC**TTTTTAAATGATGTGTAATGGTG
ABRE
 TGTTTTGTGTT**GACACGTA**TTCAATACTCATAAACAGTTATATAAAAAAGAAAAAGTTGAATGTAATTGAA
TATA-box
 GTAATAAAAAATGAAAGGAA**ATTATAA**TGTGGTTGAAGTAAATATGAATGAATGAATATAATTGAAGGAGT
Tsp
 TCGTAAGGGATAAT**TGCAGCTGCTAACACATGGAGATGCAAAAGCAACACTAACACTTTAGAGTTACAG**
 AGAGAGAGAAGAGAGAGAAGAGAGTGTAGGGGGCCACCACAATGCAACATCGCTCGTGCATGTCACGGG
 TTCGTTGGTGAGCCGCCAACACTTCCACCACAAATTCATATTTATTTCCCTGTGCTTCACTCGGTCTTTGAG
 ATTGGGAAGCATTTGGTGCTTAGCTAAGCTAAAGCTAAACCTTCAGTTTTAGCTTAGCTTCTTCTGCTTT
 TGCTTTCTCCAACCATAAACAGCCGCCACCACCACCACC**atg**

Figura 7. Promotor del gen PvAAH. El promotor del gen *PvAAH* se analizó usando los programas TSSP-TCM, PlantCare y PLACE. En minúscula y negrita se indica el codón de inicio de lectura. En negrita e identificados en la parte superior se muestran los diferentes motivos de posible regulación de la transcripción. Tsp, origen de la transcripción; TATA-box, caja TATA; ABRE, motivo de regulación por ácido abscísico y déficit hídrico; G-box, motivo de regulación por luz; LTR, motivo de regulación por baja temperatura; HTR, motivo de regulación por choque térmico; GARE motif, motivo de regulación por giberelinas; TC rich repeats, motivo de regulación por estrés biótico y abiótico; TCT-motif, motivo de regulación por luz; MBS, motivo de regulación por déficit hídrico; Box 4, WUN-motif, GT1-motif y GAG-motif motivos de regulación por luz; W box, motivo de regulación por herida. La posición de los diferentes motivos reguladores se muestra referida al inicio de la transcripción (+1).

IV. RESULTADOS

2. Caracterización de la enzima alantoato amidohidrolasa de judía

2.1. Expresión en *Escherichia coli* y purificación de la proteína recombinante His₆-PvAAH

Una vez identificado y clonado el gen *PvAAH* se abordó la caracterización bioquímica de la proteína codificada por esta secuencia. La secuencia codificante del ADNc *PvAAH*, sin la secuencia del péptido señal, se clonó en el vector *pET30b*⁺ y se expresó en *Escherichia coli* como proteína recombinante fusionada a una cola de histidinas en el extremo N-terminal.

Como se muestra en la figura 8, la inducción con IPTG de los cultivos de *E. coli* transformada con la construcción *pET30b*⁺:*PvAAH* dio como resultado la aparición en el extracto bacteriano de una proteína de aproximadamente 56 KDa (Figura 8, A), que coincidía con la masa molecular esperada para la proteína recombinante His₆-PvAAH. Por otra parte, los anticuerpos frente al péptido de polihistidinas reconocieron la proteína sobreexpresada (Figura 8, B). Como era de esperar, en los cultivos de células transformadas con el vector vacío y tratados con IPTG no se observó la inducción de ninguna proteína con un tamaño aproximado de 56 KDa (Figura 8, A y B).

La proteína His₆-PvAAH sobreexpresada en bacterias se purificó, en condiciones desnaturizantes, mediante cromatografía de afinidad con una resina con níquel. En estas condiciones y tras varios lavados, la proteína His₆-PvAAH unida a la resina se eluyó al lavar la columna con una solución a pH 4 (solución 5) (Figura 8 C y D). Fue necesario usar condiciones desnaturizantes para la purificación, ya que en condiciones nativas la His₆-PvAAH no aparecía como proteína mayoritaria en la fracción soluble de los extractos bacterianos, y tampoco quedaba retenida en la columna. Una vez purificada la proteína recombinante, se determinó su capacidad para catalizar la degradación del alantoato. Sin embargo, la proteína His₆-PvAAH purificada en estas condiciones careció de actividad enzimática, por lo que no fue posible continuar con la determinación de sus características bioquímicas y se empleó únicamente para la producción de anticuerpos, como se describe a continuación.

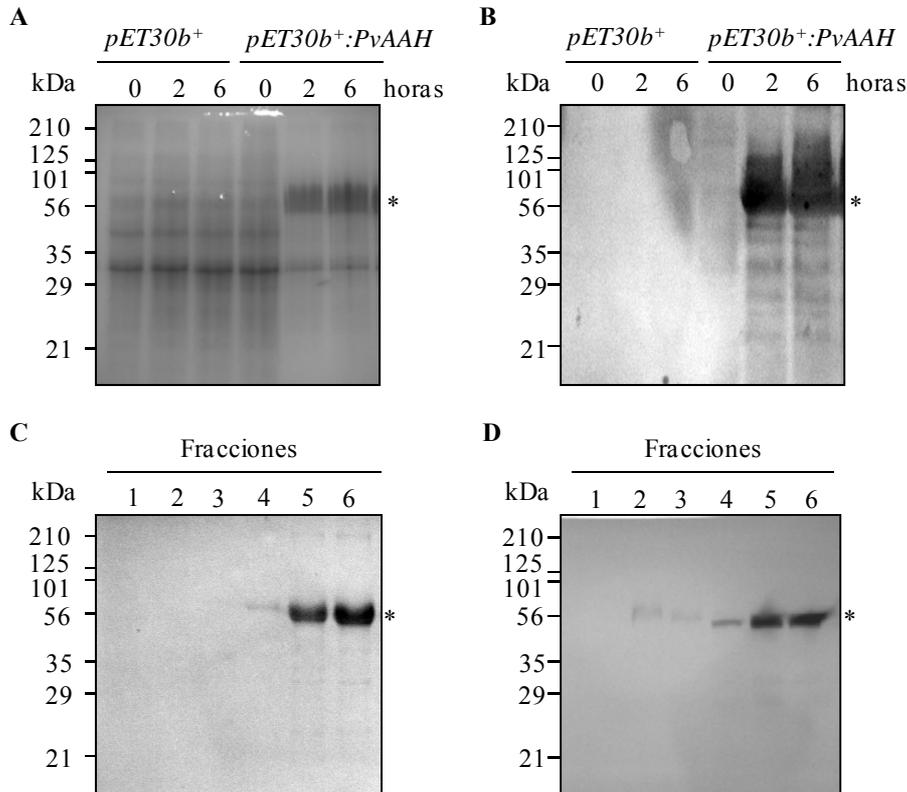


Figura 8. Expresión y purificación de la proteína recombinante His₆-PvAAH. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE al 10% en condiciones desnaturalizantes y se analizaron mediante tinción con azul de Coomassie (A y C) y por Western blot con anticuerpos frente a polihistidinas (His₆) (B y D). Se analizaron extractos crudos de cultivos de la cepa BL21 de *E. coli* transformada con las construcciones *pET30b⁺* y *pET30b⁺:PvAAH* e inducidos con IPTG durante 0, 2, 4 y 6 horas (A y B). Del mismo modo, se analizaron diferentes fracciones de la purificación de la proteína His₆-PvAAH recogidas tras lavar la columna con las soluciones: 2 (pH 7,8; fracciones 1 y 2), 3 (pH 6; fracción 3), 4 (pH 5,3; fracción 4) y tras la elución de la proteína con la solución 5 (pH 4; fracciones 5 y 6). La posición de la proteína recombinante His₆-PvAAH se indica con un asterisco.

2.2. Inmunodetección de la proteína PvAAH

Una vez purificada, la proteína His₆-PvAAH expresada en bacterias se empleó para obtener anticuerpos policlonales en conejo.

Una vez aislada la fracción de inmunoglobulinas de los sueros preinmune e inmune, ambos anticuerpos se ensayaron por Western blot empleando tanto la proteína His₆-PvAAH pura como extractos proteicos obtenidos a partir de raíces, tallos y hojas (3^a y 4^a hoja trifoliada) de plantas noduladas de judía, recogidas a los 35 DPS. Como se muestra en la figura 9, los anticuerpos reconocieron de forma

específica una proteína de aproximadamente 56 kDa, que se correspondía con la proteína His₆-PvAAH de bacterias. Sin embargo, cuando se ensayaron frente a extractos de varios tejidos de judía, estos anticuerpos no reaccionaron de forma específica con ninguna proteína cuyo tamaño coincidiera con el esperado para la proteína PvAAH. Además, las únicas proteínas presentes en los extractos de judía, cuyo tamaño podría corresponder al de la proteína PvAAH fueron reconocidas tanto por los anticuerpos del suero preinmune como del inmune. Por tanto, los anticuerpos obtenidos no fueron capaces de dar una reacción específica en los extractos de judía, probablemente debido a que la proteína PvAAH sea muy poco abundante en esos extractos.

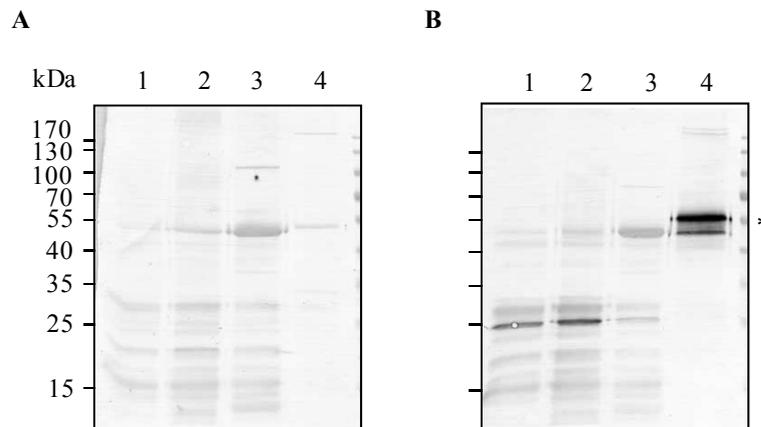


Figura 9. Análisis por Western blot de la expresión de la proteína PvAAH. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE al 10% en condiciones desnaturalizantes y se analizaron mediante Western blot usando una dilución 1/1.000 del suero preinmune (A) e inmune (B). Para la electroforesis se usaron 7,5 µg de proteína total de raíces (1), tallos (2) y hojas trifoliadas (3) de plantas noduladas de judía recogidas a los 35 DPS, así como una dilución 1/500 de la proteína His₆-PvAAH pura (4). La posición de la proteína recombinante His₆-PvAAH se indica con un asterisco.

2.3. Expresión en *Nicotiana benthamiana* y purificación de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep

Dado que la proteína His₆-PvAAH purificada de *E. coli* no presentaba actividad enzimática (apartado 2.1 de Resultados), para poder abordar el análisis funcional de la proteína PvAAH se llevó a cabo su expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Para ello, la secuencia codificante del ADNc PvAAH se

clonó en el vector *pXCS.HAStrep* y se expresó como proteína recombinante fusionada en su extremo C-terminal a la secuencia HA-StrepII. Los epítomos HA y StrepII fusionados a la proteína PvAAH se usaron para facilitar la identificación y purificación de la proteína PvAAH-HA-Strep, respectivamente.

Para la expresión de esta proteína se usaron plantas de *N. benthamiana* de 3 - 4 semanas de edad, en cuyas hojas se infiltró una pequeña cantidad de un cultivo de la cepa GV3101::pMP90RK de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con la construcción *pXCS.HAStrep:PvAAH*. Para incrementar la cantidad de proteína recombinante expresada, la misma construcción se infiltró también junto con la construcción *pBIN61:P19*, que expresa la proteína P19, supresora del silenciamiento génico del virus del enanismo del tomate. Las hojas infiltradas se recogieron a los 4 días tras la infiltración y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso. El nivel de expresión de la proteína PvAAH-HA-Strep se analizó, mediante Western blot, en extractos de estas hojas usando anticuerpos frente al epítomo HA fusionado a la proteína recombinante (Figura 10 A), así como con los anticuerpos contra la proteína PvAAH, obtenidos en el apartado anterior (Figura 10 B). Ambos anticuerpos reaccionaron frente a una misma proteína presente en los tejidos agroinfiltrados con la construcción *pXCS.HAStrep:PvAAH*. Se observó que la expresión conjunta de la proteína PvAAH-HA-Strep y la proteína supresora del silenciamiento P19 incrementaba 100 - 1.000 veces la cantidad de proteína PvAAH-HA-Strep obtenida (Figura 10, A y B), y por ello estas muestras fueron las que se usaron para la posterior purificación de la proteína.

La proteína PvAAH-HA-Strep sobreexpresada en las hojas de *N. benthamiana* se purificó mediante unión a la resina *StrepTactin Sepharose*. Tras varios lavados de la resina, que se recogieron para su análisis, se eluyeron las proteínas retenidas en la columna.

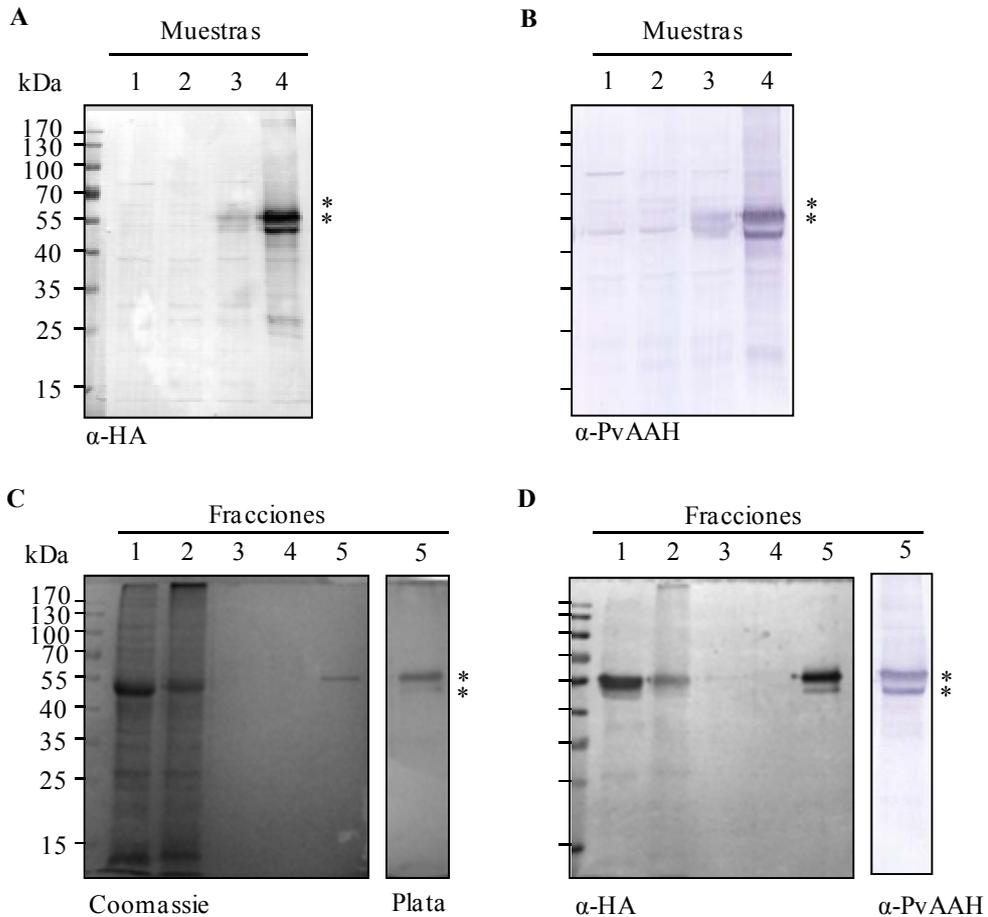


Figura 10. Expresión y purificación de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE al 10% en condiciones desnaturalizantes y se analizaron por Western blot con anticuerpos frente al epítipo HA (α -HA) y anticuerpos contra la proteína PvAAH (α -PvAAH) (A, B y D), así como mediante tinción con azul de Coomassie y plata (C). Para analizar la expresión de la proteína PvAAH-HA-Strep se usaron 10 μ g de proteína total de hojas de *N. benthamiana* sin infiltrar (1) e infiltradas con las construcciones *pXCS.HAStrep* (2), *pXCS.HAStrep:PvAAH* (3) y *pXCS.HAStrep:PvAAH + pBIN61:P19*. Para analizar la purificación de la proteína PvAAH-HA-Strep se utilizaron 10 μ l de de las siguientes muestras: extracto crudo antes de la incubación con la resina (1), fracción recogida después de la incubación con la resina (2), fracciones recogidas tras el cuarto (3) y quinto (4) lavado de la resina y la fracción recogida tras la elución de la proteína PvAAH-HA-Strep (5). La posición de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep se indica con asteriscos.

Se obtuvieron dos proteínas, una mayoritaria de aproximadamente 55 kDa y otra de unos 50 kDa, mucho menos abundante (Figura 10, C). Los tamaños de estas proteínas coincidían aproximadamente con el tamaño de la proteína deducido a partir del ADNc *PvAAH* (52,4 kDa) y con el tamaño de esta proteína sin su

péptido señal (49,4 kDa). Además, ambas proteínas fueron reconocidas específicamente por anticuerpos contra el epítipo HA, así como por los anticuerpos policlonales contra la proteína PvAAH (Figura 10, D). Este método permitió, en aproximadamente 60 min, la purificación hasta homogeneidad electroforética de entre 10 y 30 μg de proteína a partir de 0,75 gramos de material vegetal, con un rendimiento de alrededor del 50% y con un factor de purificación de entre 500 y 700. La proteína PvAAH-HA-Strep pura perdía rápidamente su actividad tras su almacenamiento en hielo o su congelación, por lo que la proteína se purificó, a partir de tejido congelado, justo antes de su uso. La actividad específica de la enzima obtenida en estas purificaciones presentó bastante variabilidad, con niveles de actividad de hasta 10 veces superiores en las purificaciones de mayor rendimiento.

2.4. Actividad enzimática de la proteína PvAAH-HA-Strep

Una vez purificada la proteína PvAAH-HA-Strep, se determinó su capacidad para catalizar la degradación del alantoato. Los ensayos de actividad se hicieron siguiendo el protocolo descrito por Werner y col. (2008), con las modificaciones que se indican en el apartado 27.2.2 de Materiales y Métodos.

Los productos de la reacción de la AAH son ureidoglicina, NH_3 y CO_2 (Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010). No obstante, la ureidoglicina puede degradarse espontáneamente para dar ureidoglicolato y NH_3 y/o glioxilato, NH_3 y urea (Werner *et al.*, 2008 y 2010). En consecuencia, la estequiometría se determinó tras calentar las muestras a 100 °C durante 10 min, de modo que toda la ureidoglicina se transformara a glioxilato.

En las condiciones de ensayo empleadas, en presencia de 3 mM de alantoato y la cantidad adecuada de la proteína PvAAH-HA-Strep pura, se observó un incremento lineal en la concentración de amonio a lo largo del tiempo. Este incremento fue estable durante al menos 30 min y varió proporcionalmente con la concentración de enzima (Figura 11, A). Además, la cantidad de amonio

producido aumentó tras añadir ureasa a la reacción. En los mismos ensayos, se determinó también la producción de glioxilato, procedente de la ureidoglicina. Como se muestra en la figura 11 (B), se produjo un incremento lineal en la concentración del glioxilato a lo largo del tiempo. Tras 30 min de reacción se obtuvieron 0,35 mM de glioxilato y 0,75 mM de amonio, en ausencia de ureasa, y 1,25 mM de amonio tras la adición de ureasa, lo que equivale a una relación de 2,14 entre la concentración de amonio y la de glioxilato producidos en ausencia de ureasa y de 3,57 tras la adición de la misma (Figura 11, B).

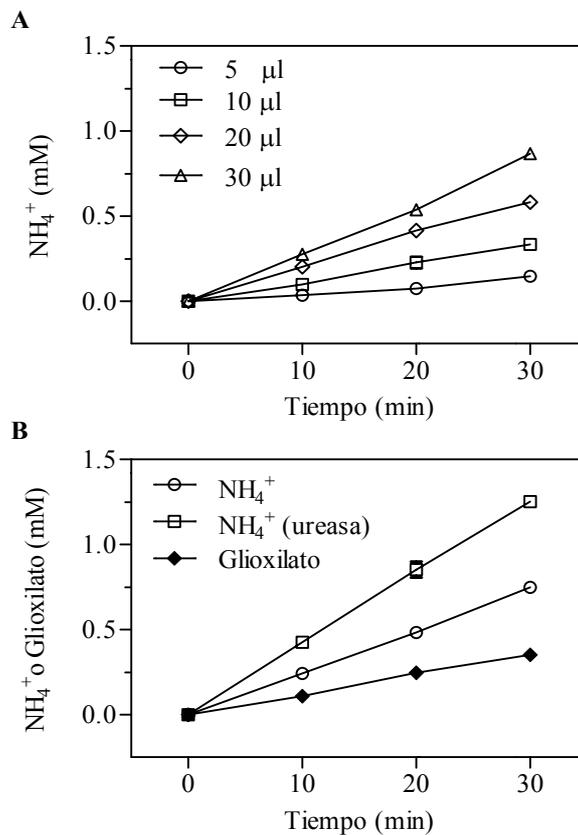


Figura 11. Actividad enzimática y estequiometría en la reacción catalizada por la proteína PvAAH-HA-Strep. A. La producción de amonio se determinó en partes alícuotas tomadas a los tiempos indicados de mezclas de reacción estándar (3 mM de alantoato) pero con varias concentraciones de la proteína PvAAH-HA-Strep pura. B. Cinética de la producción de glioxilato (♦) y amonio en ausencia de ureasa (○) y con ureasa (□), en presencia de 3 mM de alantoato y la proteína PvAAH-HA-Strep pura. Estos resultados son la media y la desviación estándar de 2 determinaciones.

Se ensayó también si la enzima PvAAH-HA-Strep podía usar ureidoglicolato como sustrato. Sin embargo, en ensayos similares a los anteriores, pero con ureidoglicolato como sustrato, no se observó producción de amonio.

En el momento de comenzar este trabajo se había descrito la purificación parcial y la caracterización de una actividad enzimática, dependiente de la fenilhidrazina, con la capacidad de degradar el alantoato en frutos de judía (Raso *et al.*, 2007a). Para determinar si la proteína PvAAH-HA-Strep se correspondía con esta actividad enzimática, se determinó la capacidad de catalizar la degradación del alantoato de la proteína PvAAH-HA-Strep pura, así como de las diferentes fracciones recogidas a lo largo de su purificación, usando tanto el ensayo basado en el método descrito por Werner y col. (2008) (Actividad AAH;), como el descrito por Raso y col. (2007a) (Actividad PH-alcasa). Dado que el DTT, necesario para la purificación de la proteína PvAAH-HA-Strep, interfería con la determinación de la actividad PH-alcasa, las muestras procedentes de la purificación se dializaron antes de los ensayos. La diálisis se hizo usando columnas *SpinTrap* G25 y el tampón de ensayo de la actividad PH-alcasa descrito por Raso y col. (2007a).

Los resultados de estos ensayos mostraron que con ambos métodos se detectaba actividad capaz de catalizar la degradación del alantoato en el extracto crudo (antes de la incubación con la resina de afinidad) (Figura 12, A y B), pero sólo usando el método descrito por Werner y col. (2008) se detectaba actividad en la fracción donde se encontraba la proteína PvAAH-HA-Strep ya purificada (Figura 12, A). En cambio, usando el método descrito por Raso y col. (2007a), sólo se detectó actividad en el extracto crudo y en la primera fracción recogida tras la incubación del extracto con la resina (Figura 12, B). Estos resultados indicaban que la proteína responsable de la actividad enzimática PH-alcasa no se unía a la resina de afinidad y, por tanto, su actividad no aparecía tras la purificación, lo que implica que la actividad PvAAH es distinta de la actividad PH-alcasa dependiente de fenilhidrazina caracterizada por Raso y col. (2007a).

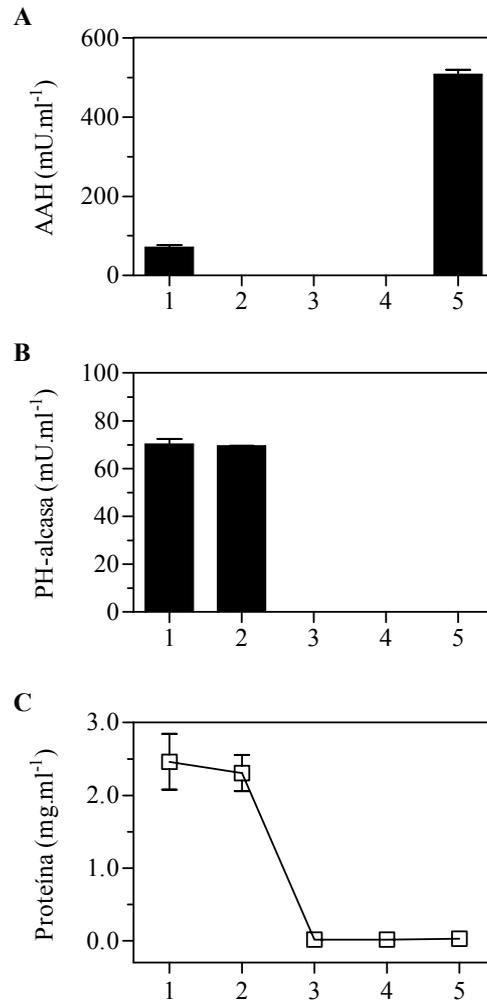


Figura 12. Actividad catalizadora de la degradación del alantoato y contenido de proteína en las fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína PvAAH-HA-Strep. A. Valores de actividad enzimática usando una modificación del método descrito por Werner y col. (2008) (AAH). B. Valores de actividad enzimática usando el método descrito por Raso y col. (2007a) (PH-alcasa). C. Contenido de proteína. La actividad se ensayó en las siguientes muestras: extracto crudo, antes de la incubación con la resina (1), fracción recogida después de la incubación con la resina (2), fracciones recogidas tras el cuarto (3) y quinto lavado de la resina (4), y la fracción recogida tras la elución de la proteína PvAAH-HA-Strep (5). En las gráficas se muestran la media y desviación estándar de 4 determinaciones independientes.

2.5. Caracterización de la enzima PvAAH-HA-Strep

Una vez comprobada la capacidad de la proteína PvAAH-HA-Strep para catalizar la degradación del alantoato, se determinaron algunas de sus características bioquímicas. En primer lugar, se determinaron aquellos parámetros que podían servir para optimizar las condiciones del ensayo enzimático, como temperatura y pH óptimos, efecto de cationes divalentes, etc.

Como se observa en la figura 13 (A), la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep fue máxima a pH 8, y mucho menor con valores de pH menores de 7 y superiores a 10. La mayor actividad se encontró incubando la mezcla de reacción a 40 °C (Figura 13, B). En estos ensayos se observó que la actividad específica fue menor en las determinaciones de pH que en las de temperatura, probablemente debido a un posible efecto inhibitor de la solución de fosfato usada en la determinación del pH óptimo de ensayo.

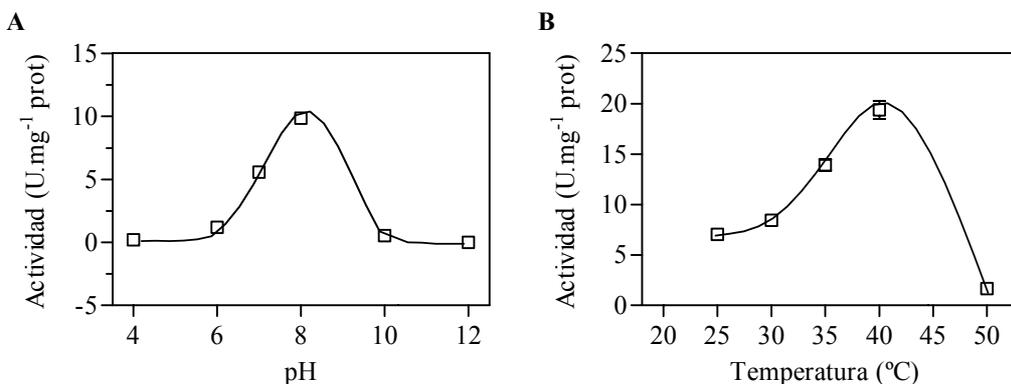


Figura 13. Determinación del pH y la temperatura de ensayo de la reacción catalizada por la proteína PvAAH-HA-Strep. Para la determinación del pH (A) y la temperatura (B) óptima se usó la proteína PvAAH-HA-Strep pura. En las determinaciones del pH óptimo se usaron diferentes soluciones fosfato ajustadas a los pH indicados, y las reacciones se llevaron a cabo a 37 °C durante un tiempo máximo de 20 min. En las determinaciones de la temperatura óptima se usó tampón Tea-NaOH 50 mM a pH 8, y las reacciones se llevaron a cabo a las temperaturas indicadas durante 20 min. Los resultados que se muestran son la media y la desviación estándar de 4 determinaciones.

Diferentes autores han observado un efecto activador del manganeso sobre la actividad de las AAHs tanto en plantas como en bacterias (Vogels, 1966; Winkler *et al.*, 1985; Werner *et al.*, 2008), mientras que Agarwal y col. (2007), al

cristalizar la AAH de *E. coli*, identificaron al zinc como su cofactor. Para estudiar el efecto de estos cationes divalentes, así como del EDTA, sobre la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep se llevaron a cabo ensayos enzimáticos con la proteína PvAAH-HA-Strep pura, en presencia o ausencia de estos compuestos (Tabla 5). Para evitar la interferencia del manganeso en estas determinaciones, este metal no se incluyó ni en los tampones usados para la purificación de la proteína, ni en las posteriores reacciones enzimáticas. Una vez purificada, partes alícuotas de la proteína PvAAH-HA-Strep se incubaron durante 15 minutos a 4 °C con las concentraciones de Mn, Zn y EDTA que se indican. Tras la incubación, se determinó la actividad siguiendo el ensayo estándar. Como control se usó el valor de actividad de la proteína PvAAH-HA-Strep pura, incubada durante 15 minutos a 4 °C sin la adición de ninguno de estos compuestos.

Tabla 5. Efecto del manganeso, zinc y EDTA sobre la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep. Para estas determinaciones, la proteína PvAAH-HA-Strep se purificó usando tampones que no contenían Mn. La actividad AAH se ensayó tras incubar la proteína PvAAH-HA-Strep durante 15 minutos a 4 °C, con Mn, Zn o EDTA a las concentraciones indicadas o en ausencia de ellos (control). Los resultados que se muestran en la tabla son la media y la desviación estándar de 4 determinaciones.

	<i>Actividad (U.mg⁻¹.prot)</i>	
	<i>50 μM</i>	<i>100 μM</i>
<i>Control</i>	10,89 ± 0,15	10,48 ± 0,57
<i>Mn</i>	31,17 ± 0,15	31,91 ± 0,07
<i>Zn</i>	8,35 ± 0,15	0,00 ± 0,00
<i>EDTA</i>	4,40 ± 0,22	3,63 ± 0,42

Como se muestra en la tabla 5, el manganeso tuvo un efecto activador, incrementando la actividad de la enzima tres veces con respecto al control cuando se usó a una concentración de 50 μM. Por el contrario, al añadir zinc a la reacción, la actividad se redujo un 20% a una concentración final de 50 μM, y se inhibió completamente a una concentración final de 1 mM. Del mismo modo, el EDTA inhibió la actividad hasta un 50%, tanto a una concentración de 50 μM como de 1

mM. Por otra parte, la actividad de la proteína PvAAH-HA-Strep purificada usando tampones que no contenían manganeso fue un 25% menor que con manganeso (Figura 13, B).

Una vez establecidas las condiciones óptimas de ensayo para la proteína PvAAH-HA-Strep se determinaron sus constantes cinéticas. En primer lugar, se determinó la actividad de la proteína PvAAH-HA-Strep con concentraciones variables de alantoato, comprendidas entre 5 μM y 1 mM. Como se muestra en la figura 14 (A), la actividad de esta enzima se ajustó a una cinética de Michaelis-Menten y mediante la representación gráfica de la ecuación de Hanes-Woolf, se determinó una K_m de 0,46 mM, con una actividad específica de 20 U/mg proteína (Figura 14, B).

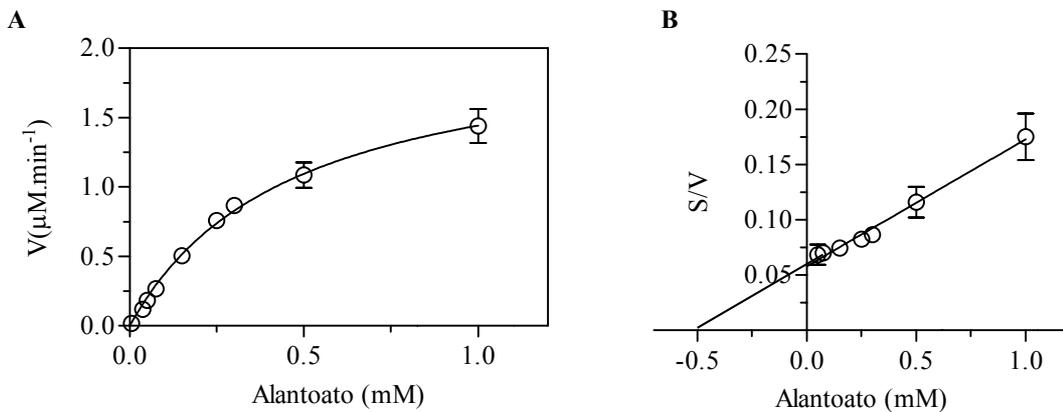


Figura 14. Cinética enzimática de la proteína PvAAH-HA-Strep. A. Valores de actividad enzimática expresada como μM de amonio producido por minuto (v) a diferentes concentraciones de alantoato (mM). B. Determinación de los valores de K_m aparente mediante la representación de Hanes-Woolf ($[s]/v$ versus $[s]$). En las gráficas se muestran la media y desviación estándar de 4 determinaciones independientes.

Durante la determinación de las condiciones óptimas de este ensayo enzimático se observó habitualmente que la reacción dejaba de ser lineal a partir de los 20 - 30 min. Dado que los parámetros cinéticos de la enzima permiten descartar que se trate de una pérdida de actividad por agotamiento de sustrato, ensayamos la posible inhibición por producto. El producto de la reacción de la

AAH es la ureidoglicina, que *in vitro* es inestable y puede descomponerse a glioxilato (Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010). Para determinar el efecto del glioxilato sobre la actividad de la proteína PvAAH-HA-Strep, la enzima purificada mediante el protocolo estándar se dializó a través de una columna *SpinTrap G25* con tampón de lavado sin DTT. A continuación, se incubó durante 15 minutos a 4 °C con una concentración final de 1 y 2,5 mM de glioxilato. Seguidamente, la proteína se dializó de nuevo en el tampón de lavado sin DTT, para eliminar el glioxilato, y se determinó su actividad. El ensayo se hizo en ausencia de DTT en la reacción, para evitar que este compuesto pudiera revertir la posible inhibición por oxidación del glioxilato. Como se muestra en la figura 15, la incubación de la proteína PvAAH-HA-Strep con 1 y 2,5 mM de glioxilato produjo una inhibición de aproximadamente un 40% en la actividad de esta enzima.

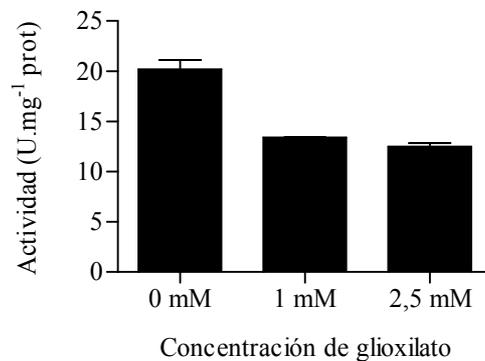


Figura 15. Efecto del glioxilato sobre la actividad de la enzima PvAAH-HA-Strep. La proteína PvAAH-HA-Strep pura se dializó en tampón sin DTT y se incubó durante 15 minutos a 4 °C con las concentraciones de glioxilato indicadas. A continuación, la proteína PvAAH-HA-Strep se dializó de nuevo para eliminar el glioxilato y se determinó su actividad. En la gráfica se muestran la media y desviación estándar de 4 determinaciones independientes.

2.6. Expresión de la proteína PvAAH en tejidos de *P. vulgaris*

La actividad PvAAH se determinó en extractos crudos de raíces, tallos y hojas (3^a y 4^a hoja trifoliada) de plantas noduladas de 35 DPS (Figura 16).

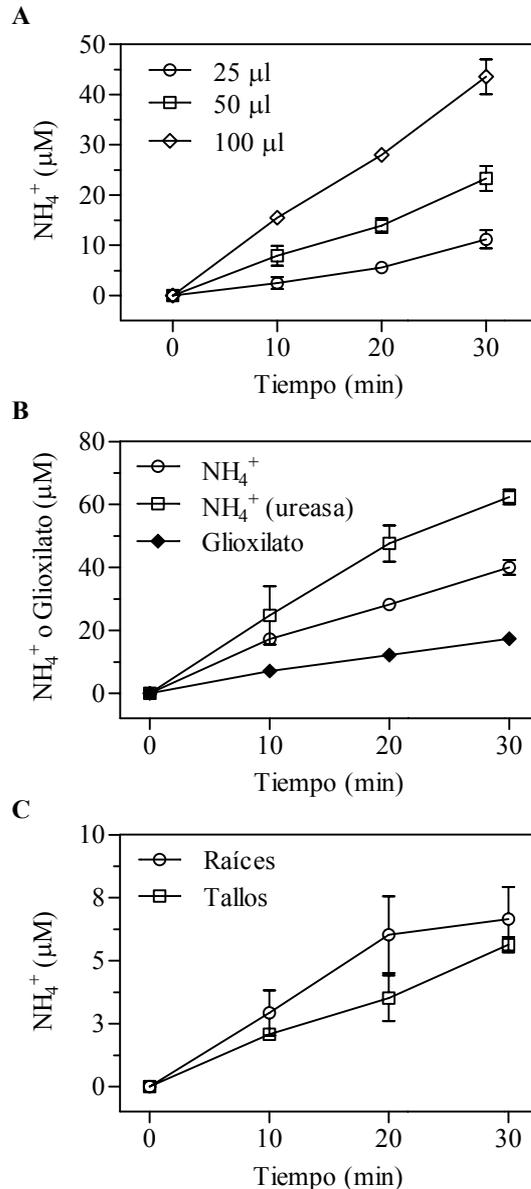


Figura 16. Incremento en la concentración de amonio y glioxilato en el ensayo de actividad de la enzima PvAAH en diferentes tejidos de *P. vulgaris*. A. Cinética de la producción de amonio con diferentes cantidades de extracto de hojas de judía. B. Cinética de la producción de glioxilato (◆) y amonio con extracto de hojas de judía en ausencia de ureasa (○) y en presencia de ureasa (□). C. Cinética de la producción de amonio con extractos de raíces (○) y tallos (□) de judía. Las muestras se calentaron a 100 °C durante 10 min previamente a la determinación de amonio y glioxilato. Excepto para determinar la producción de amonio en presencia de ureasa, en los ensayos se incluyó PPD. En todos los casos, los extractos se dializaron a través de columnas *SpinTrap G25*. Se analizaron muestras de raíces, tallos y hojas (3^a y 4^a hojas trifoliadas) de plantas noduladas de judía recogidas a los 35 días tras la siembra. En las figuras se muestran la media y desviación estándar de 4 determinaciones independientes.

Cuando se analizaron extractos de hojas, se detectó un incremento lineal a lo largo del tiempo en la concentración de amonio. Este incremento se produjo sólo al incluir el extracto de hojas en la reacción y fue proporcional a la cantidad del mismo en el ensayo (Figura 16, A). Al igual que ocurría con la proteína PvAAH-HA-Strep pura, en esta reacción también se observó un incremento lineal a lo largo del tiempo en la concentración de glioxilato, con una relación de 2,31 entre la concentración de amonio y glioxilato producidos en ausencia de ureasa y de 3,61 al incluir ureasa en la reacción (Figura 16, B).

Del mismo modo, se ensayó esta actividad en extractos de raíces y tallos de judía. En estos casos se observó un incremento lineal en la concentración de amonio sólo durante los primeros 15 – 20 min de reacción (Figura 16, C). No obstante, en los ensayos con extractos de raíces y tallos no fue posible determinar de forma clara la estequiometría de la reacción, debido probablemente al bajo nivel de actividad en estos tejidos (Figuras 16, C y 17, A).

En los tejidos de judía donde previamente se había determinado la actividad enzimática de la proteína PvAAH (AAH; Figuras 16 y 17, A), se determinó también la actividad catalizadora de la degradación del alantoato dependiente de fenilhidrazina (PH-alcasa; Figura 17, B). La actividad PH-alcasa, contrariamente a la actividad AAH, mostró los valores más altos de actividad en extractos de raíz y los menores en hojas. Además, en estas mismas muestras, se determinaron los niveles de expresión del gen *PvAAH* (Figura 17, C) y el contenido en alantoato (Figura 17, D). Los niveles de expresión del gen *PvAAH* fueron mucho mayores en hojas que en tallos o raíces (Figura 17, C), lo que se correspondía con el mayor nivel de la actividad AAH en las hojas (Figura 17, A). De forma similar, el mayor contenido de alantoato también se encontró en las hojas, mientras que el menor se observó en raíces (Figura 17, D).

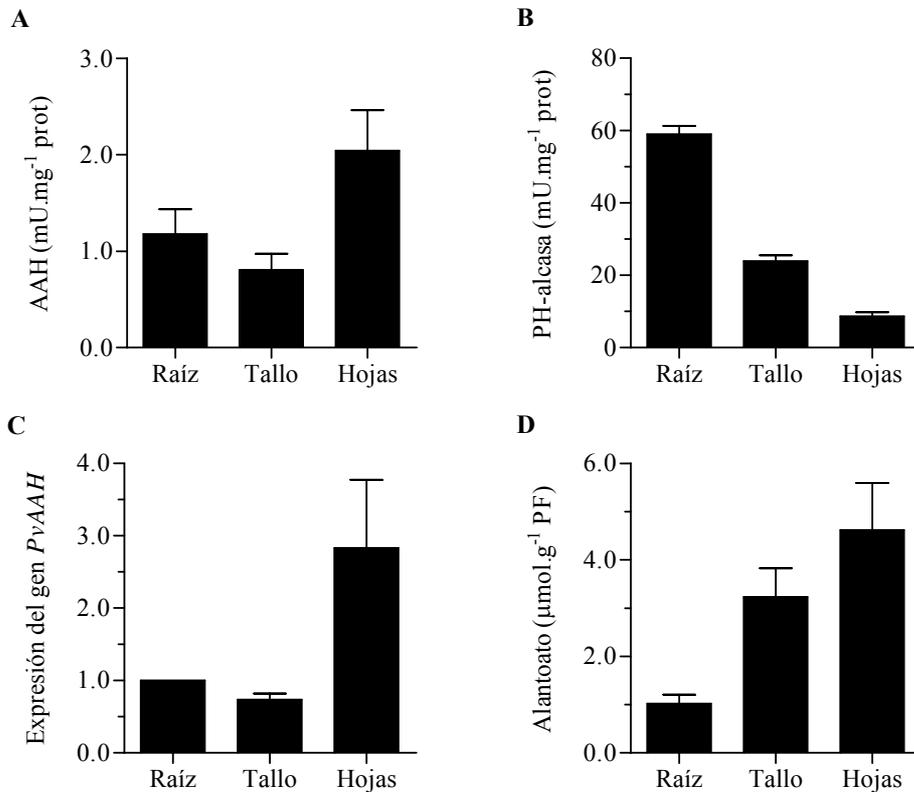


Figura 17. Actividades de la degradación enzimática del alantoato, expresión del gen *PvAAH* y niveles de alantoato en tejidos de *P. vulgaris*. Las actividades catalizadoras de la degradación del alantoato AAH (A) y PH-alcasa (B), la expresión del gen *PvAAH* (C) y el contenido de alantoato (D) se analizaron en muestras de raíces, tallos y hojas trifoliadas de plantas de judía de 35 días cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno. La expresión del gen *PvAAH* se determinó mediante RT-PCR cuantitativa, fue normalizada con respecto a los niveles de *Actina 2* y se hizo relativa a la expresión del gen *PvAAH* en raíces. Estos resultados son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

2.7. Silenciamiento génico de la enzima *PvAAH* en *P. vulgaris*

Con objeto de comprobar si efectivamente la degradación del alantoato está catalizada exclusivamente por la alantoato amidohidrolasa o por varias enzimas, se llevó a cabo el silenciamiento génico de la enzima *PvAAH* en judía. Para bloquear la expresión del gen *PvAAH*, se generó una construcción tipo “horquilla” empleando el vector *pFGC5941*, en el que se clonó un fragmento de la región 3’ del gen *PvAAH* en sentido directo y reverso, a ambos lados de un fragmento de ADN que actúa como espaciador, para que se pueda generar la “horquilla”. Con

esta construcción y el vector vacío usado como control, se infectaron plántulas de judía usando la cepa k599 de *Agrobacterium rhizogenes* como vehículo. Tres semanas después de la infección, se recogieron las raíces pilosas que se habían formado y se analizaron los niveles de expresión del gen *PvAAH*, así como la capacidad de degradar el alantoato (actividades AAH y PH-alcasa) y el contenido en alantoato (Figura 18).

Como se muestra en la figura 18 (A), los niveles de expresión del gen *PvAAH* en las muestras de raíces pilosas procedentes de plantas transformadas con la construcción de silenciamiento fueron aproximadamente un 50% inferiores a los observados en las muestras de las plantas control, generadas tras la transformación con el vector vacío *pFGC5941*.

Del mismo modo, para confirmar si este descenso en la expresión del gen *PvAAH* se traducía en un descenso de la actividad catalizadora de la degradación del alantoato, en los mismos tejidos se determinó su capacidad para degradar el alantoato usando tanto el método descrito para actividad AAH (Figura 18, B), como para la PH-alcasa (Figura 18, C). Como se muestra en la figura 18 (B), la actividad AAH se redujo más de un 60% en las muestras procedentes de plantas transformadas con la construcción de silenciamiento. Por el contrario, la actividad PH-alcasa no mostró cambios significativos (Figura 18, C). Con respecto a los niveles de alantoato (Figura 18, D), se observó un incremento de alrededor del 40% en el contenido de alantoato en las muestras de raíces pilosas transformadas con la construcción de silenciamiento del gen *PvAAH*. Sorprendentemente, tanto los niveles de alantoato (Figura 18, D) como los valores de actividad de la enzima *PvAAH* (Figura 18, B) en las muestras de raíces pilosas de plántulas de judía fueron muy superiores a los encontrados normalmente en extractos de las raíces normales analizadas en otros apartados (Figura 17, D), lo que se debe probablemente a la diferencia entre ambos tipos de tejidos.

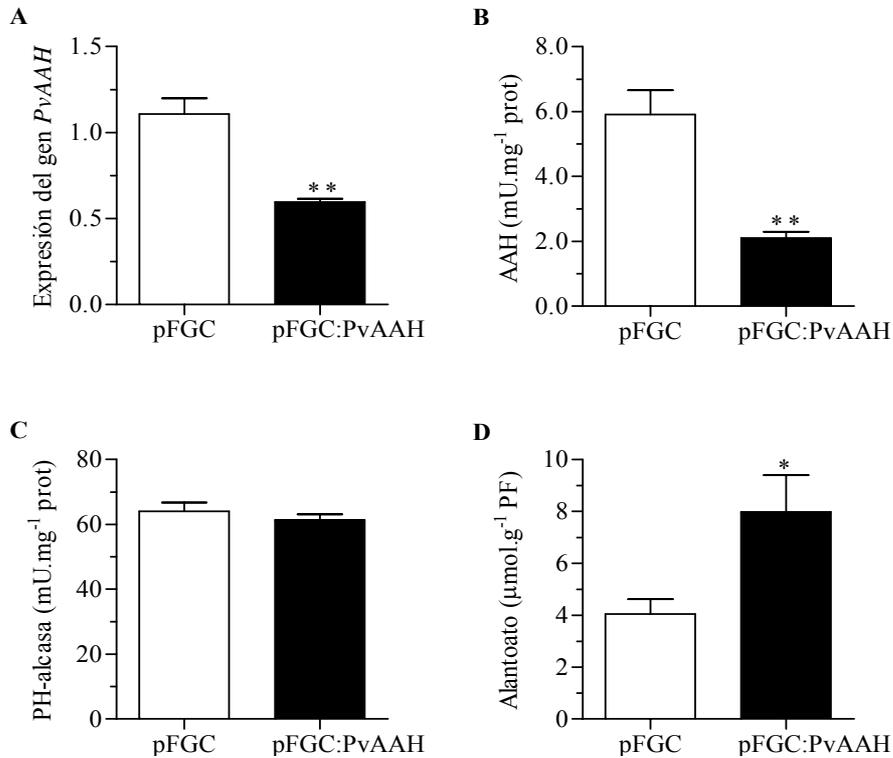


Figura 18. Efecto del silenciamiento de la expresión del gen *PvAAH* en raíces de judía. La expresión del gen *PvAAH* (A), las actividades catalizadoras de la degradación del alantoato AAH (B) y PH-alcasa (C) y el contenido de alantoato (D) se analizaron en muestras de raíces pilosas procedentes de plantas transformadas con el vector vacío *pFCG5941* (pFGC), como control, y con la construcción de silenciamiento para el gen *PvAAH*, *pFCG5941:PvAAH* (pFGC:PvAAH). Los niveles de expresión del gen *PvAAH* se normalizaron con respecto a la expresión del gen *Actina 2* y se hicieron relativos a la expresión del gen *PvAAH* en las muestras control. Para el análisis estadístico se usó la prueba t de Student con el programa informático Graphpad: * indica diferencias significativas ($P < 0,05$) y ** diferencias muy significativas ($P < 0,01$).

IV. RESULTADOS

3. Regulación del metabolismo de los ureidos a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*

3.1. Cambios en el contenido de ureidos a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*

Diversos autores han mostrado que la síntesis de ureidos sigue cinéticas diferentes en las etapas vegetativa y reproductiva del desarrollo de la planta (Herridge y Peoples, 1990). Asimismo, se han encontrado niveles considerables de ureidos tanto en leguminosas no noduladas como en plantas no leguminosas (Thomas *et al.*, 1980; Brychkova *et al.*, 2008). Para estudiar cómo afecta el estado de desarrollo de las plantas y la fuente de nitrógeno al metabolismo de los ureidos, en primer lugar, se determinaron los niveles de ureidos a lo largo del desarrollo de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN; noduladas) o fertilizadas con nitrato. Se recogieron muestras de raíces, tallos y hojas trifoliadas (3^a y 4^a hoja trifoliada) a los 21, 28, 35, 42 y 49 días después de la siembra (DPS). De este modo, el periodo de tiempo en el que se recogieron las muestras incluyó tanto la fase vegetativa, plantas de 21 - 28 DPS, como la reproductiva, 35 - 49 DPS. Las plantas noduladas y las fertilizadas con nitrato presentaron tamaños similares en cada uno de los muestreos (Tabla 6), si bien las plantas fertilizadas con nitrato mostraron un ligero retraso en la floración, en comparación con las plantas noduladas. El 80% de las plantas noduladas habían florecido ya a los 35 DPS, mientras que sólo el 42% de las plantas fertilizadas con nitrato tenían flores en ese mismo periodo.

La determinación del contenido de ureidos en los tejidos de estas plantas mostró que las concentraciones de alantoína y alantoato aumentaban a lo largo del desarrollo en raíces, tallos y hojas trifoliadas de las plantas noduladas (Figura 19). Este aumento se debió principalmente al incremento en la concentración de alantoato en los tallos y hojas de plantas noduladas, mientras que en raíces aumentaban paralelamente alantoína y alantoato. En raíces, los niveles de ureidos aumentaron alrededor de dos veces entre los 21 y 28 DPS. En cambio, en tallos y hojas, tras un primer incremento en el contenido de ureidos entre los 21 y 28 DPS, se produjo un segundo incremento mucho mayor a los 35 DPS, que coincidió con

el inicio de la floración de la mayoría de las plantas (Tabla 6). Tras el incremento a 35 DPS, la concentración de ureidos en los tallos se mantuvo alta durante todo el desarrollo, mientras que en hojas el contenido de ureidos descendió a los 42 DPS y volvió a aumentar a los 49 DPS.

Tabla 6. Parámetros de crecimiento de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno o fertilizadas con nitrato. En la tabla se muestran el número de nudos por planta, porcentaje de plantas con flores y la ausencia (-) o presencia (+) de frutos. Los datos se tomaron de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) y de plantas no noduladas y fertilizadas con nitrato (Nitrato) a los días tras la siembra (DPS) indicados. Los datos representan la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes. En cada experimento y condición se analizaron entre 16 - 20 plantas.

<i>DPS</i>	<i>FBN</i>			<i>Nitrato</i>		
	<i>Nudos</i>	<i>Flores (%)</i>	<i>Frutos</i>	<i>Nudos</i>	<i>Flores (%)</i>	<i>Frutos</i>
21	5 ± 2	0 ± 0	-	5 ± 2	0 ± 0	-
28	6 ± 2	15 ± 4	-	7 ± 2	0 ± 0	-
35	7 ± 3	84 ± 3	+	9 ± 4	42 ± 5	+
42	8 ± 3	100 ± 0	+	9 ± 3	100 ± 0	+
49	8 ± 2	100 ± 0	+	9 ± 2	100 ± 0	+

Los niveles de ureidos fueron inferiores en las plantas fertilizadas con nitrato que en plantas noduladas, excepto a los 21 DPS. En este periodo inicial del desarrollo de la planta, los niveles de ureidos en plantas fertilizadas con nitrato fueron iguales e incluso algo superiores a los observados en plantas noduladas. En las plantas fertilizadas con nitrato, los niveles de ureidos fueron menores en las raíces y hojas trifoliadas a los 35 DPS, mientras que los valores más altos se observaron en los tallos y hojas a los 49 DPS. El incremento en el contenido de ureidos observado a 49 DPS en tallos y hojas de plantas fertilizadas con nitrato alcanzó concentraciones que llegaron al 50% de las observadas en estos tejidos de plantas noduladas a 49 DPS (Figura 19).

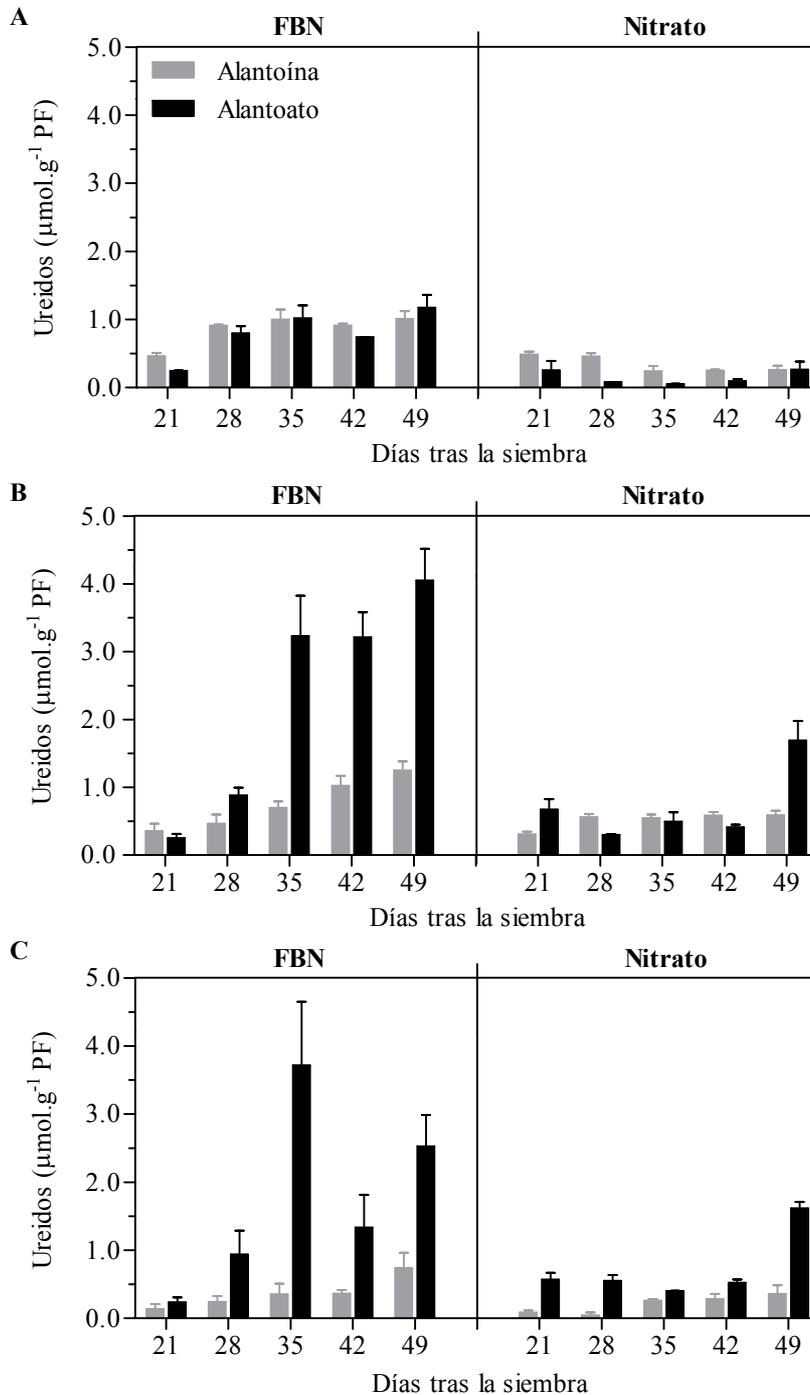


Figura 19. Contenido en ureidos a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. Contenido en alantoína (barras grises) y alantoato (barras negras) en raíces (A), tallos (B) y hojas trifoliadas (C) de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) o fertilizadas con nitrato (Nitrato). Se analizaron muestras de plantas recogidas a los días tras la siembra indicados. Los datos que se muestran corresponden a la media y a la desviación estándar de 4 experimentos independientes.

3.2. Evolución de la fijación de nitrógeno a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*

Para determinar si el incremento en los niveles de ureidos observado a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris* (Figura 19) se correspondía con valores más altos en la tasa de fijación de nitrógeno, se midió este último parámetro en plantas noduladas de judía a los 21, 28, 35, 42 y 49 DPS. La fijación de nitrógeno se determinó como actividad nitrogenasa aparente (ANA) y actividad nitrogenasa total (ANT). Los valores más altos de ANA (Figura 20, A) y ANT (Figura 20, B) se observaron a los 28 DPS. Tras el máximo a 28 DPS, el ANA y el ANT descendieron hasta alcanzar sus valores más bajos a 49 DPS.

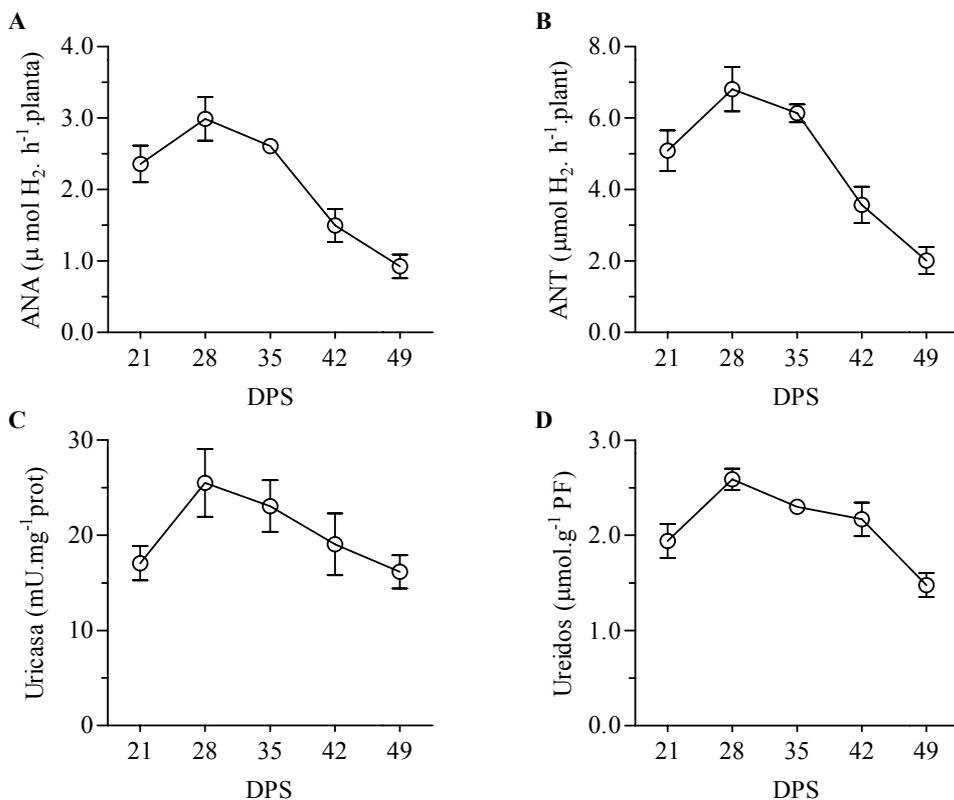


Figura 20. Evolución de la fijación de nitrógeno, actividad uricasa y contenido de ureidos en nódulos a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. A. Actividad nitrogenasa aparente (ANA). B. Actividad nitrogenasa total (ANT). C. Contenido de ureidos en nódulos (alantoína más alantoato). D. Actividad uricasa en nódulos. Se analizaron muestras de plantas de judía recogidas a los días tras la siembra (DPS) indicados. Los resultados que se muestran son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

Además de la fijación de nitrógeno, se determinó la actividad uricasa, una nodulina tardía y enzima clave en la fijación de nitrógeno (Sanchez *et al.*, 1987), así como el contenido de ureidos en nódulos de plantas de judía recogidos entre los 21 y los 49 DPS. Como se esperaba, la actividad uricasa (Figura 20, C) y el contenido en ureidos (Figura 20, D) mostraron cinéticas muy similares a las de la ANA y la ANT, con los mayores valores a 28 DPS y los menores a 49 DPS.

A diferencia de la fijación de nitrógeno, el peso fresco de nódulos por planta (Tabla 7) fue máximo entre los 35 y 42 DPS, mientras que los mayores valores de peso seco de nódulos por planta se obtuvieron a los 35 DPS (Tabla 7). La diferente evolución a lo largo del desarrollo del peso fresco de los nódulos por planta respecto al resto de parámetros (fijación de nitrógeno, actividad uricasa, contenido de ureidos y peso seco de los nódulos por planta) se debió posiblemente a que muchos de los nódulos recogidos a partir de los 35 DPS ya eran nódulos senescentes.

Tabla 7. Peso fresco y peso seco de nódulos por planta a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. Las muestras se corresponden a los nódulos recogidos de plantas de judía a los días después de la siembra (DPS) indicados. Estos resultados son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

<i>DPS</i>	<i>21</i>	<i>28</i>	<i>35</i>	<i>42</i>	<i>49</i>
<i>Peso fresco de nódulos (g/planta)</i>	0,18±0,04	0,50±0,06	0,66±0,07	0,64±0,08	0,32±0,04
<i>Peso seco de nódulos (g/planta)</i>	0,04±0,01	0,06±0,01	0,12±0,01	0,06±0,01	0,02±0,01

3.3. Cambios en la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de los ureidos en nódulos a lo largo del desarrollo de judía

Además de los parámetros mostrados en el apartado anterior de Resultados, en nódulos de plantas de judía recogidos entre los 21 y 49 DPS se analizó también la expresión de los genes de la enzima uricasa (*PvOU*), alantoinasa (*PvALN.1*, *PvALN.2*) y de la alantoato amidohidrolasa (*PvAAH*). Como se muestra en la figura 21, la expresión de estos 4 genes siguió un patrón que concuerda con la

cinética de la fijación de nitrógeno (Figura 20, A y B), con los mayores niveles de expresión entre los 21 - 28 DPS y los menores alrededor de los 49 DPS.

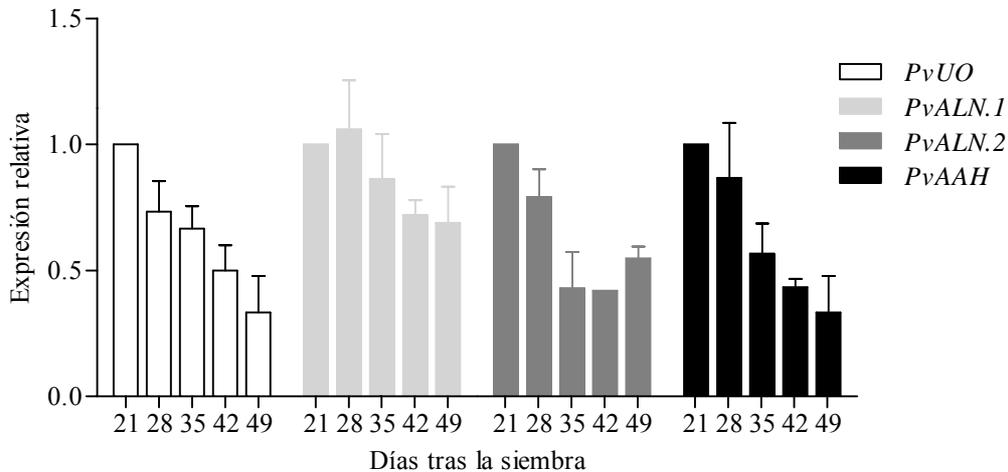


Figura 21. Expresión relativa del ARNm de los genes *PvUO*, *PvALN.1*, *PvALN.2* y *PvAAH* en nódulos a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a la expresión del gen de la *Actina 2* en cada muestra y se presentan relativos a la expresión a 21 DPS de cada gen. Se analizaron muestras de nódulos de plantas de judía recogidos entre los 21 y 49 DPS. Estos resultados son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

3.4. Cambios en la expresión y actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de los ureidos en raíces, tallos y hojas a lo largo del desarrollo de la planta

Dado que el compuesto ureídico que se encontraba mayoritariamente en los tejidos vegetativos de judía era el alantoato (Figura 19), en las muestras donde previamente se habían determinado los niveles de ureidos (Resultados, apartado 3.1) se analizaron también la expresión y la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis (alantoinasa) y en la degradación del alantoato (AAH o PH-alcasa).

3.4.1. Expresión y actividad de la enzima alantoinasa en raíces, tallos y hojas a lo largo del desarrollo

En plantas, la enzima alantoinasa es la responsable de la síntesis del alantoato. En esta leguminosa existen dos genes con un alto grado de homología de secuencia

que codifican la enzima alantoinasa (*PvALN.1* y *PvALN.2*). No obstante, sólo uno de ellos, el gen *PvALN.1*, se expresa en raíces, tallos y hojas (Díaz-Leal *et al.*, 2012). Por ello, en este trabajo se muestran sólo los niveles de expresión del gen *PvALN.1*.

Como se muestra en la figura 22, los mayores niveles de expresión del gen *PvALN.1* se observaron en los tallos de las plantas noduladas. Además, en este tejido se observó un aumento de la expresión del gen *PvALN.1* a lo largo del desarrollo. Este incremento con el desarrollo también se observó en los tallos de plantas fertilizadas con nitrato, aunque fue menor y más tardío que el observado en tallos de plantas noduladas. En cambio, en raíces y hojas trifoliadas de plantas noduladas y fertilizadas con nitrato la expresión del gen *PvALN.1* no sufrió cambios significativos a lo largo del desarrollo.

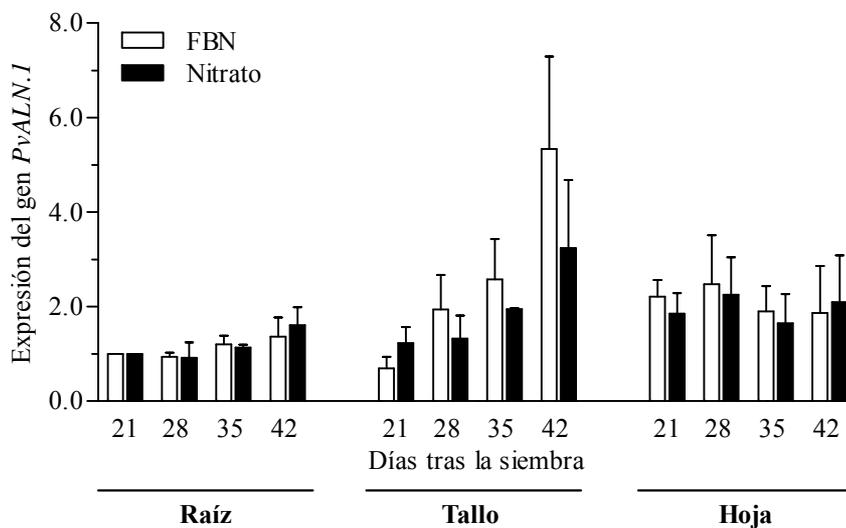


Figura 22. Expresión relativa del gen *PvALN.1* en raíces, tallos y hojas trifoliadas a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. Se analizaron muestras de raíces, tallos y hojas trifoliadas procedentes de plantas cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) o fertilizadas con nitrato (Nitrato) recogidas a los días de ser sembradas indicados. Los niveles de expresión del gen *PvALN.1* se normalizaron con respecto a la expresión de la *Actina 2* y se hicieron relativos a la expresión de *PvALN.1* en raíces de 21 días de cada una de las condiciones de cultivo. Estos resultados son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

De modo similar a la expresión del gen *PvALN.1*, la actividad alantoinasa fue mayor en tallos que en raíces y hojas, tanto en plantas noduladas como fertilizadas con nitrato. Además, en tallos de plantas noduladas se observó un gran incremento de la actividad alantoinasa a lo largo del desarrollo. Este incremento en la actividad alantoinasa también se produjo en tallos de las plantas fertilizadas con nitrato, aunque fue menor y ocurrió más tarde que en las plantas noduladas. La actividad alantoinasa fue mayor en las plantas noduladas que en las fertilizadas con nitrato en todas las muestras, excepto a 21 DPS, que fue similar en ambas condiciones de cultivo (Figura 23).

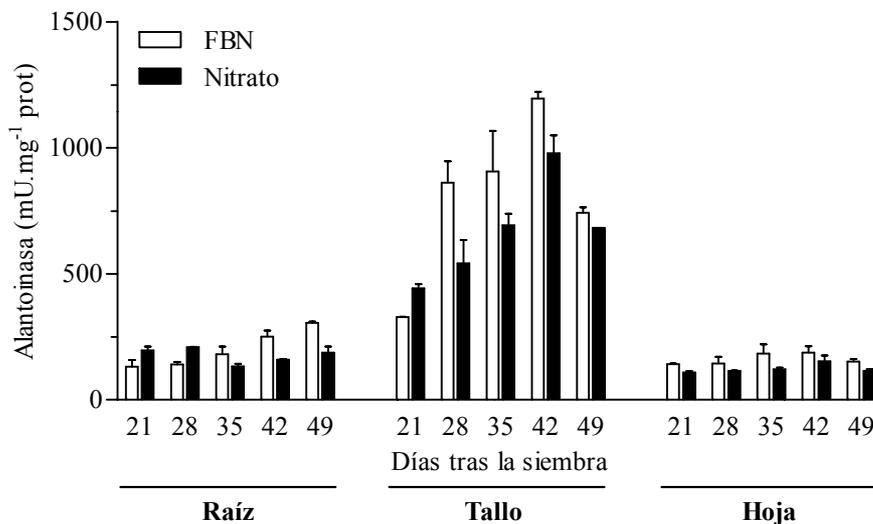


Figura 23. Actividad alantoinasa en raíces, tallos y hojas trifoliadas a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. Se analizaron muestras de raíces, tallos y hojas trifoliadas procedentes de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) o fertilizadas con nitrato (Nitrato), recogidas en los tiempos indicados. Estos resultados son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

3.4.2. Expresión y actividad de las enzimas involucradas en la degradación del alantoato a lo largo del desarrollo de judía

Como se mostró en el primer capítulo de Resultados, en judía parece que existen dos actividades enzimáticas capaces de catalizar *in vitro* la degradación del alantoato: la actividad AAH y la actividad PH-alcasa. En cambio, la única

secuencia identificada en judía hasta el momento que codifique una proteína que catalice la degradación del alantoato es la del gen *PvAAH* (Resultados, apartado 1.1). Por ello, en las muestras donde se determinó la expresión y actividad de la enzima alantoinasa se analizó también la expresión del gen *PvAAH*.

A diferencia del gen *PvALN.1*, cuya expresión fue máxima en los tallos, los mayores niveles de expresión del gen de la alantoato amidohidrolasa (*PvAAH*) se encontraron en las hojas (Figura 24). La expresión de este gen fue similar en las plantas noduladas y en las fertilizadas con nitrato. En las raíces, tallos y hojas de plantas noduladas, la mayor expresión del gen *PvAAH* se observó entre los 28 - 35 DPS, coincidiendo con el momento de máxima fijación de nitrógeno en estas plantas (Figura 20). En raíces y tallos de plantas fertilizadas con nitrato, la expresión del gen *PvAAH* no sufrió cambios significativos, a excepción de un descenso a 35 DPS, mientras que en las hojas trifoliadas de esas plantas se observó un incremento en la expresión del gen *PvAAH* a lo largo del desarrollo.

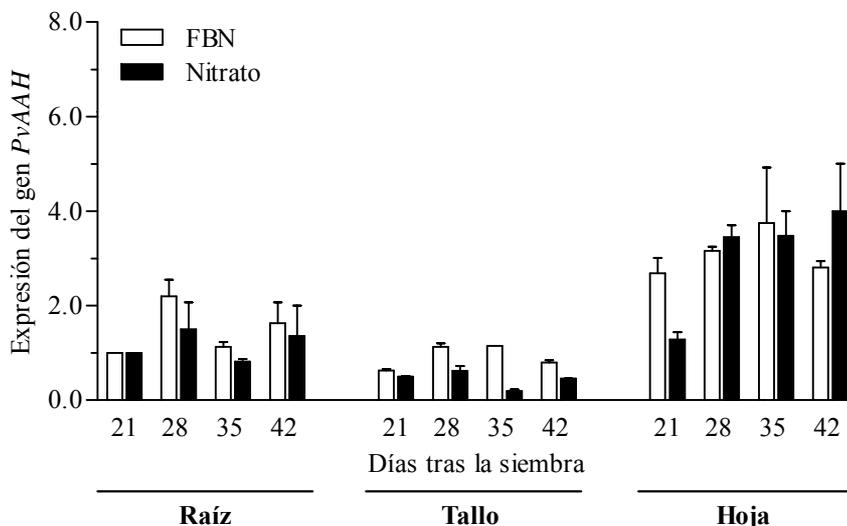


Figura 24. Expresión relativa del gen *PvAAH* en raíces, tallos y hojas trifoliadas a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. Se analizaron muestras de raíces, tallos y hojas trifoliadas procedentes de plantas cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) o fertilizadas con nitrato (Nitrato) recogidas a los DPS indicados. Los niveles de expresión del gen *PvAAH* se normalizaron con respecto a la expresión de la *Actina 2* y se hicieron relativos a la expresión en raíces a 21 DPS de *PvAAH* en cada condición de cultivo. En la figura se presentan la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

Dado que sólo en hojas se observaron cambios significativos en la expresión del gen *PvAAH* y que en este tejido se encontraron también los mayores niveles de expresión, las actividades catalizadoras de la degradación de alantoato AAH y PH-alcasa se ensayaron en las muestras de la 3ª y 4ª hoja trifoliada de plantas de judía noduladas y fertilizadas con nitrato (Figura 25), donde previamente se había determinado la expresión del gen *PvAAH*.

La actividad AAH fue máxima a 21 DPS, y descendió a lo largo del desarrollo de la planta, hasta alcanzar sus valores más bajos entre los 42 y los 49 DPS. El descenso en la actividad AAH con el desarrollo ocurrió tanto en las plantas noduladas como en las fertilizadas con nitrato (Figura 25, A). Además, se observaron mayores niveles de actividad AAH en las hojas de las plantas noduladas que en las de plantas fertilizadas con nitrato, al igual que ocurría con la actividad alantoinasa (Figura 24). A diferencia de la actividad AAH, la actividad PH-alcasa se mantuvo sin cambios significativos tanto en las hojas de las plantas noduladas como en las hojas de las plantas fertilizadas con nitrato (Figura 25, B).

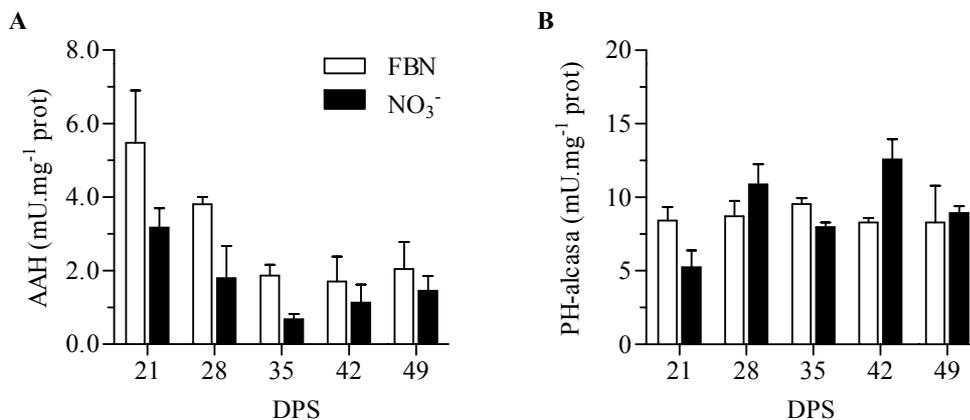


Figura 25. Actividades degradadoras de alantoato en hojas trifoliadas a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. Las actividades AAH (A) y PH-alcasa (B) se midieron en muestras de hojas trifoliadas procedentes de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) o fertilizadas con nitrato (Nitrato), recogidas entre los 21 y 49 días de ser sembradas (DPS). Los resultados que se muestran son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

3.5. Contenido de ureidos y actividad alantoinasa en hoja primaria y hoja superior a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*

Dado que los ureidos son compuestos de transporte de N, su contenido en un tejido está influenciado por su síntesis, su degradación y por el transporte. Por este motivo, además de determinar el contenido de ureidos en la 3ª y 4ª hoja trifoliada de plantas de judía a lo largo del desarrollo (Figura 19), se midió el contenido de ureidos y la actividad alantoinasa en las hojas primarias (más viejas) y en hojas superiores no expandidas (más jóvenes) de plantas de judía noduladas y de plantas fertilizadas con nitrato, recogidas entre los 21 y 49 DPS.

Como se muestra en la figura 26 (A y B), el contenido de ureidos se mantuvo en niveles bajos y sin cambios a lo largo del tiempo de desarrollo analizado en hojas primarias tanto de plantas noduladas como fertilizadas con nitrato. Por el contrario, en las hojas más jóvenes de plantas noduladas se observó un brusco incremento en el contenido de ureidos a los 35 DPS, mientras que en las mismas hojas de las plantas fertilizadas con nitrato se observó un aumento gradual en el contenido de ureidos a lo largo de todo el desarrollo de la planta. Sorprendentemente, la concentración de ureidos en las hojas superiores fue similar en las plantas noduladas y en las plantas fertilizadas con nitrato y mayor que el observado tanto en las hojas primarias como en las hojas trifoliadas de estas plantas (Figura 19).

En las mismas muestras donde se determinó el contenido en ureidos se midió también la actividad alantoinasa (Figura 26, C y D). En las hojas primarias, la actividad alantoinasa fue similar en las plantas noduladas y en las fertilizadas con nitrato. La actividad alantoinasa en hojas primarias de plantas noduladas aumentó a lo largo del desarrollo, mientras que en plantas fertilizadas con nitrato esta actividad no sufrió cambios significativos. En cambio, la actividad alantoinasa en las hojas superiores mostró un patrón similar en plantas noduladas y fertilizadas con nitrato. Los valores de actividad alantoinasa encontrados en las hojas superiores, aún en desarrollo, fueron mayores a los observados tanto en las hojas

primarias (Figura 26, C y D) como en las hojas trifoliadas previamente analizadas de estas plantas (Figura 23) y los valores fueron similares en plantas noduladas y fertilizadas con nitrato.

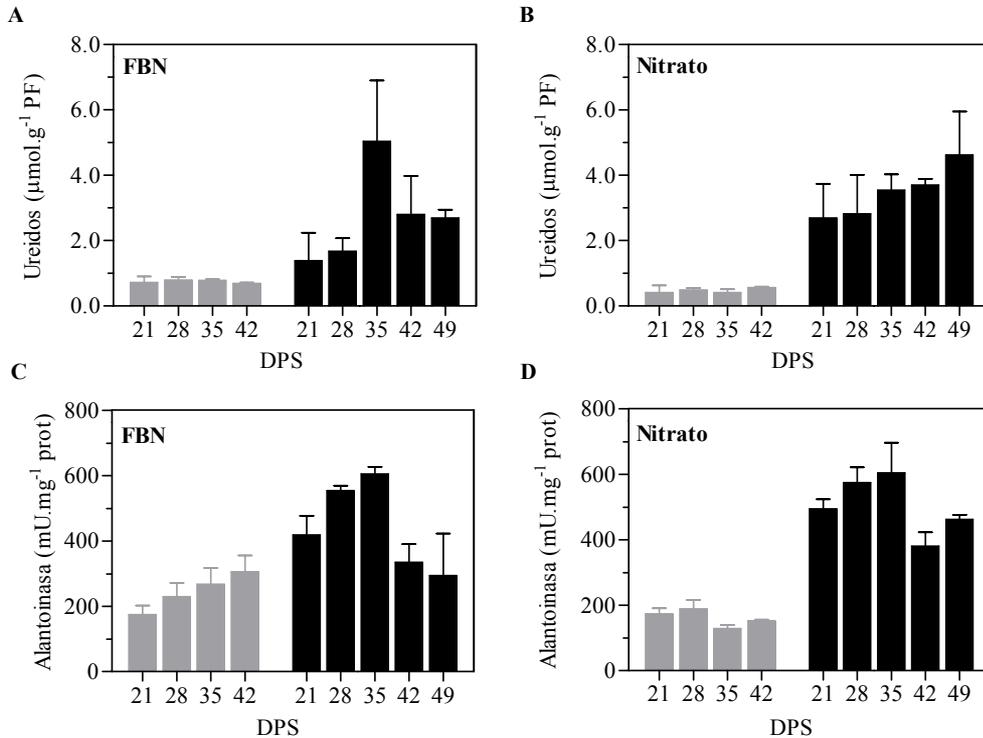


Figura 26. Contenido de ureidos y actividad alantoinasa en hoja primaria y hoja superior a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. Concentración de ureidos (alantoína más alantoato) y actividad alantoinasa en hojas primarias (barras grises) y hojas superiores no expandidas (barras negras) a lo largo del desarrollo de plantas de judía noduladas (FBN) y fertilizadas con nitrato (Nitrate). Estos resultados son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

3.6. Cambios en el contenido de aminoácidos, ureidos y nitrato en el xilema a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*

El contenido en aminoácidos, ureidos y nitrato se analizó en el xilema de plantas de judía noduladas y fertilizadas con nitrato entre los 21 y 49 DPS. Las muestras de xilema de cada planta se recogieron durante 20 min y siempre entre las 12:00 y las 13:00 horas para evitar interferencias en las concentraciones debidas a los

cambios en la transpiración de la plantas a lo largo del día. Cada una de las muestras provenía de la mezcla del xilema recogido de 4 plantas diferentes.

En la figura 27 (A y B) se muestran los perfiles de los 4 aminoácidos más abundantes encontrados en el xilema tanto de las plantas noduladas como en el de las plantas fertilizadas con nitrato: aspartato (Asp), asparragina (Asn), glutamato (Glu) y glutamina (Gln).

Como se muestra en la figura 27 (A), los aminoácidos más abundantes en el xilema de plantas noduladas fueron la Asn y la Gln, seguidos por el Asp y el Glu. El contenido en Asp y Asn en el xilema de estas plantas siguió un patrón muy similar, observándose los mayores niveles de ambos aminoácidos en las muestras recogidas a los 21, 42 y 49 DPS. El periodo entre los 28 y 35 DPS, donde se observaron las menores concentraciones de Asp y Asn, coincidió con el incremento en los niveles de ureidos (Figura 27, C). El contenido en Gln y Glu aumentó a lo largo del desarrollo de la planta, hasta alcanzar las mayores concentraciones a los 42 DPS, siguiendo un patrón muy similar al del contenido en ureidos en estas muestras. En el xilema de las plantas fertilizadas con nitrato, la Asn fue el aminoácido más abundante, seguido por el Asp, el Glu y la Gln. En estas plantas, el contenido de Asn aumentó durante el desarrollo de la planta hasta alcanzar los mayores niveles a los 42 DPS, con concentraciones 8 veces superiores a las de Gln, Glu y Asp (Figura 27, B).

Como se muestra en la figura 27 (C), en el xilema de plantas noduladas se observó un gran incremento de la concentración de ureidos (principalmente alantoato) a lo largo del desarrollo de la planta, con las mayores concentraciones de ureidos a los 42 DPS. En el xilema de las plantas fertilizadas con nitrato se encontraron niveles de ureidos significativos, aunque inferiores a los observados en el xilema de plantas noduladas. Además, en el xilema de las plantas fertilizadas con nitrato se observó también un incremento en el contenido de ureidos a lo largo del desarrollo, alcanzando a los 42 DPS concentraciones de hasta el 40% de las observadas en el xilema de plantas noduladas.

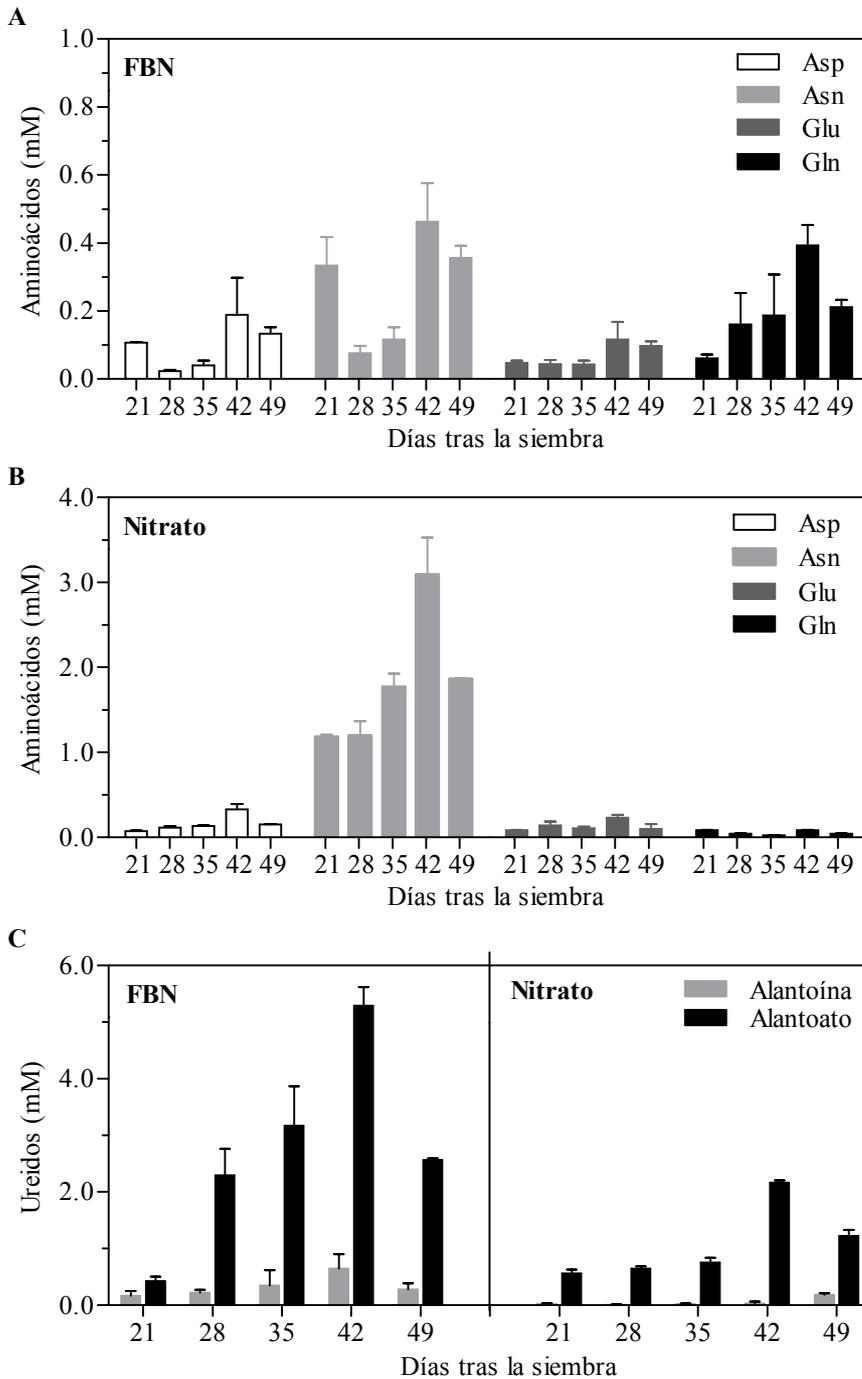


Figura 27. Contenido de aminoácidos y ureidos en el xilema a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. Contenido en aspartato (Asp), asparragina (Asn), glutamato (Glu) y glutamina (Gln) en el xilema de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) (A) o fertilizadas con nitrato (Nitrato) (B). Contenido en alantoína y alantoato en el xilema de plantas cultivadas en FBN o fertilizadas con nitrato (C). Las muestras de xilema se tomaron a los días tras la siembra indicados y cada muestra corresponde a la mezcla del xilema de al menos 4 plantas diferentes. Estos resultados son la media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Como se esperaba, el contenido en nitrato en el xilema de plantas noduladas fue muy inferior al de las plantas fertilizadas con nitrato y no sufrió grandes cambios a lo largo del desarrollo de la planta (Tabla 8). En el xilema de plantas fertilizadas con nitrato, su contenido alcanzó concentraciones entre 2 y 4 veces superiores al de la solución nutritiva con la que se regaron estas plantas (10 mM).

Tabla 8. Distribución de los compuestos nitrogenados en el xilema a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris*. La concentración de ureidos (alantoína más alantoato), aminoácidos y nitrato se determinó en muestras de xilema de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) o fertilizadas con nitrato (Nitrato) tomadas a los días tras la siembra (DPS) indicados. El contenido relativo en nitrógeno ureídico (RUN) se calculó como se describe en el texto (Herridge, 1982).

DPS	Ureidos (mM)		Aminoácidos (mM)		Nitrato (mM)		RUN (%)	
	FBN	Nitrato	FBN	Nitrato	FBN	Nitrato	FBN	Nitrato
21	0,6±0,2	0,6±0,1	1,1±0,3	2,2±0,1	0,9±0,6	23,9±7,2	54,5±2,1	8,58±0,5
28	2,8±1,0	0,6±0,1	0,6±0,2	2,3±0,4	0,4±0,1	17,7±1,8	91,6±0,4	10,9±0,1
35	3,9±1,7	0,7±0,1	0,8±0,1	3,3±0,5	0,3±0,1	16,7±3,1	93,6±0,6	12,5±3,3
42	5,5±0,7	2,2±0,1	2,3±0,8	5,8±0,5	0,6±0,4	41,9±8,0	88,6±3,1	15,7±1,9
49	2,8±0,1	1,4±0,2	1,7±0,1	3,5±0,1	0,4±0,1	23,1±5,8	84,1±0,7	17,7±1,4

El contenido en ureidos, aminoácidos y nitrato se usó para determinar el contenido relativo en nitrógeno ureídico (RUN) a lo largo del desarrollo de *P. vulgaris* (Tabla 8), según la fórmula: $RUN = 100 \times [(4 \times \text{concentración mM de ureidos}) / (4 \times (\text{concentración mM de ureidos} + \text{nitrato} + \text{aminoácidos}))]$ (Herridge, 1982). En las plantas noduladas, el RUN fue máximo entre los 28 - 35 DPS (91 - 93%), coincidiendo con el periodo de mayor fijación de nitrógeno (Figura 20, A y B). Tras este máximo entre los 28 y 35 DPS, el RUN en plantas noduladas se mantuvo en valores entre el 84 y 88%. En el xilema procedente de las plantas fertilizadas con nitrato, el RUN tuvo un valor de aproximadamente el 10% durante el desarrollo vegetativo de la planta (21 - 28 DPS) y del 17% durante su fase reproductiva (35 - 49 DPS).

IV. RESULTADOS

4. Regulación del metabolismo del alantoato en *P. vulgaris* por otros factores exógenos y endógenos

4.1. Cambios en el metabolismo de los ureidos durante la transición de la fase vegetativa a la reproductiva

Como se mencionó en el apartado 3.1 de Resultados, en las hojas trifoliadas de plantas noduladas de judía se observó un brusco incremento del contenido de ureidos coincidiendo con el inicio de la floración (35 DPS). Para estudiar en más detalle estos cambios en el metabolismo de los ureidos, se determinó la evolución de su contenido en hojas recogidas cada dos días, desde los 26 DPS (antes de la floración) hasta los 42 DPS (varios días tras la floración). Asimismo, se determinó de forma más precisa el momento de floración de las plantas noduladas y de las plantas fertilizadas con nitrato (Figura 28).

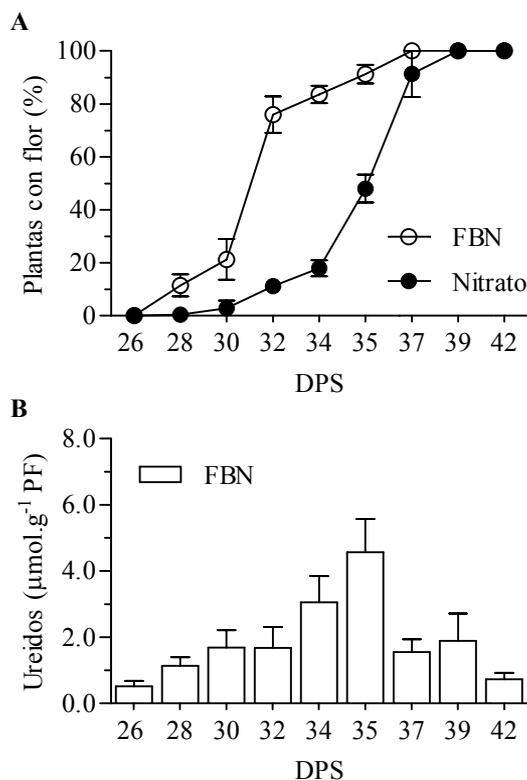


Figura 28. Estado de floración y contenido de ureidos en plantas noduladas y fertilizadas con nitrato. A. El porcentaje de plantas con flor se determinó en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) y de fertilización con nitrato (Nitrato) cada dos días entre los 26 y 42 DPS. B. El contenido de ureidos (alantoína más alantoato) se determinó en muestras de la 3ª y 4ª hoja trifoliada recogidas a los DPS indicados de plantas cultivadas en condiciones de FBN. Los datos son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

Como se muestra en la figura 28 (A), entre el 80 y 100% de las plantas cultivadas en FBN florecieron entre los 32 y 35 días después de la siembra, mientras que sólo el 10 y el 50% de las plantas fertilizadas con nitrato habían florecido a los 32 y 35 DPS, respectivamente. En las hojas trifoliadas de plantas noduladas de judía se observó un incremento brusco en el contenido de ureidos (principalmente alantoato) a los 35 DPS (Figura 28, B), que coincidía con el momento en que todas las plantas mostraban las primeras flores.

Para determinar si existía alguna relación entre la floración temprana observada en plantas noduladas y el incremento de ureidos encontrado a 35 DPS en las hojas de estas plantas (Figura 28), se determinó el momento de floración de plantas noduladas de judía tratadas con alopurinol, que es un inhibidor competitivo de la enzima xantina deshidrogenasa y, por tanto, de la síntesis de ureidos. Para analizar el efecto del alopurinol sobre la floración, plantas noduladas de judía y cultivadas en FBN se regaron, a partir de los 26 DPS (varios días antes del inicio de la floración), con una solución de riego que contenía alopurinol 0,1 mM. El riego con alopurinol se repitió 3 veces por semana, y cada dos días se determinó el estado de floración y se recogieron muestras de hojas trifoliadas.

Como se muestra en la figura 29, al igual que las plantas no tratadas con alopurinol (Figura 28, A), el 100% de las plantas tratadas con alopurinol florecieron entre los 32 y 35 DPS (Figura 29, A). Como se esperaba, los niveles de ureidos en las hojas trifoliadas de las plantas tratadas con alopurinol fueron mucho menores que los observados en las plantas no tratadas y no variaron significativamente durante la floración (Figura 29, B).

4.2. Cambios en el contenido de carbohidratos en plantas noduladas de judía y fertilizadas con nitrato

Con el objeto de investigar otros factores que pudieran causar la diferencia en el tiempo de floración observada entre las plantas noduladas y las fertilizadas con nitrato (Figura 28, A), se determinó el contenido en almidón y azúcares solubles

(glucosa, fructosa y sacarosa) en la 3ª hoja trifoliada de plantas de 28 DPS cultivadas en condiciones de FBN o fertilizadas con nitrato. Para evitar posibles interferencias del efecto de las horas de luz sobre el contenido de carbohidratos de la planta, todas las muestras se recogieron entre las 11:00 y las 11:30 de la mañana.

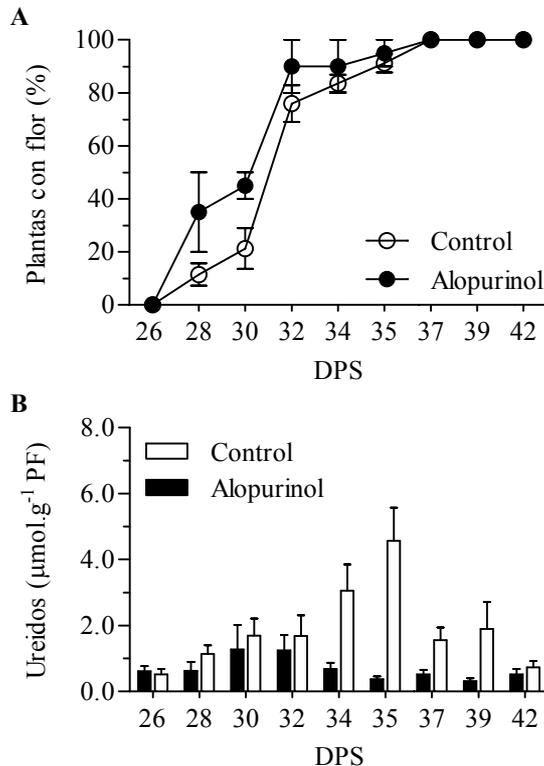


Figura 29. Efecto del alopurinol sobre el estado de floración y el contenido de ureidos en plantas noduladas de judía. Porcentaje de plantas con flor (A) y contenido de ureidos (alantoína más alantoato) (B) en plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno regadas con una solución que contenía alopurinol 0,1 mM, a partir de los 26 DPS. Como control se usaron plantas noduladas de la misma edad que no fueron regadas con alopurinol. Los datos son la media y desviación estándar de 2 experimentos independientes.

Como se muestra en la figura 30, el contenido de almidón fue superior al del resto de carbohidratos analizados tanto en plantas noduladas como en las fertilizadas con nitrato. Además, el contenido en almidón fue muy superior en las plantas noduladas que en las fertilizadas con nitrato (Figura 30, A). En las plantas

noduladas, el azúcar soluble más abundante fue la glucosa, seguido por la sacarosa (Figura 30, B). Por el contrario, el azúcar soluble más abundante en las plantas fertilizadas con nitrato fue la sacarosa. Al igual que el almidón, el contenido de glucosa en hojas de plantas de judía cultivadas en FBN fue muy superior al observado en hojas de las plantas fertilizadas con nitrato.

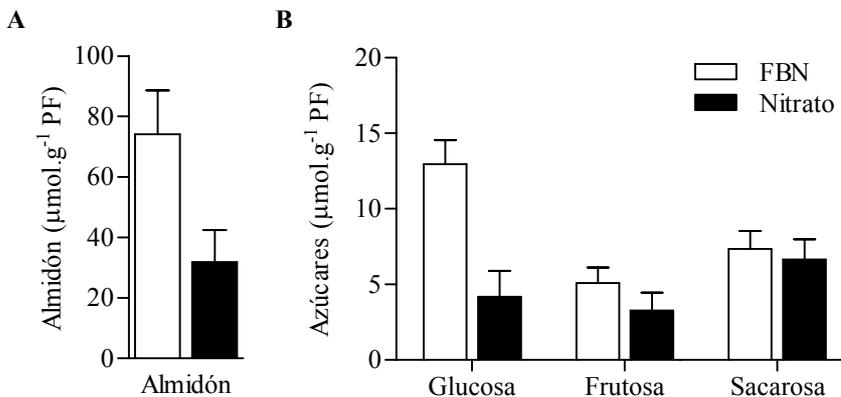


Figura 30. Contenido de azúcares al comienzo de la floración en *P. vulgaris*. El contenido de almidón (A) y azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) (B) se analizó en muestras de la 3^a hoja trifoliada de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) o fertilizadas con nitrato (Nitrato), recogidas a los 28 días después de la siembra. Los resultados que se muestran son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

Además del contenido de carbohidratos, se determinaron también los parámetros de biomasa y tamaño de las hojas de plantas de 28 días de edad tanto noduladas como fertilizadas con nitrato (Tabla 9). Asimismo, se determinó el contenido de proteína soluble total y de clorofilas (clorofila a y b) en hojas de estas mismas plantas.

Como se muestra en la tabla 9, tanto el tamaño como el peso fresco de las hojas trifoliadas de las plantas fertilizadas con nitrato fueron mayores que los de las hojas de las plantas cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno. En cambio, las plantas noduladas mostraron una mayor relación PS/PF que las plantas fertilizadas con nitrato, lo que indicaba un mayor contenido en agua en la hojas procedentes de las plantas fertilizadas con nitrato. Asimismo, el contenido en

clorofilas y en proteína soluble total de las plantas fertilizadas con nitrato fue superior al de las plantas noduladas.

Tabla 9. Biomasa, tamaño de hojas y contenido de proteína soluble total y clorofilas en hojas de plantas de judía noduladas o fertilizadas con nitrato. Se analizaron muestras recogidas a los 28 días tras la siembra de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno (FBN) o fertilizadas con nitrato (Nitrato). Los valores corresponden a la 3ª y 4ª hoja trifoliada salvo los de tamaño que son de la 3ª hoja trifoliada (longitud x anchura de los foliolos). Para el análisis estadístico se usó la prueba t de *Student* del programa informático *GraphPad*: a indica diferencias significativas ($P < 0,05$), b diferencias muy significativas ($P < 0,03$), c diferencias extremadamente significativas ($P < 0,0001$).

<i>Condiciones de cultivo</i>	<i>Biomasa foliar</i>		<i>Relación PS/PF</i>	<i>Tamaño (cm²)</i>	<i>Proteína (mg/g PF)</i>	<i>Clorofila (mg/g PF)</i>
	<i>g PF</i>	<i>g PS</i>				
<i>FBN</i>	1,20±0,07	0,27±0,02	0,22±0,02	33,64±3,70	9,49±0,99	2,49±0,08
<i>Nitrato</i>	1,93 ^c ±0,15	0,20 ^b ±0,01	0,10 ^c ±0,01	47,16 ^a ±3,82	12,55 ^a ±1,60	2,78 ^a ±0,10

Con objeto de determinar si el alto contenido de carbohidratos en las plantas noduladas ocurría sólo antes de la floración, se determinaron los niveles de carbohidratos en la 3ª y 4ª hoja trifoliada de plantas noduladas de judía a lo largo del desarrollo de la planta (21 - 49 DPS). Como se muestra en la figura 31 (A), el contenido de almidón aumentó entre los 21 y los 28 DPS y después descendió progresivamente hasta alcanzar los niveles más bajos a 49 DPS. Además, entre los 21 y 28 DPS se observó un brusco incremento en el contenido de glucosa en hojas, que coincidió con el comienzo de la floración de estas plantas (Figura 31, B). Tras este incremento antes de la floración, los niveles de glucosa se mantuvieron elevados a lo largo del resto del desarrollo de la planta. El contenido de fructosa en hojas aumentó progresivamente a lo largo del desarrollo, alcanzándose los mayores valores a los 49 DPS. Por su parte, el contenido de sacarosa sufrió sólo un ligero aumento entre los 21 y los 49 DPS (Figura 31, B).

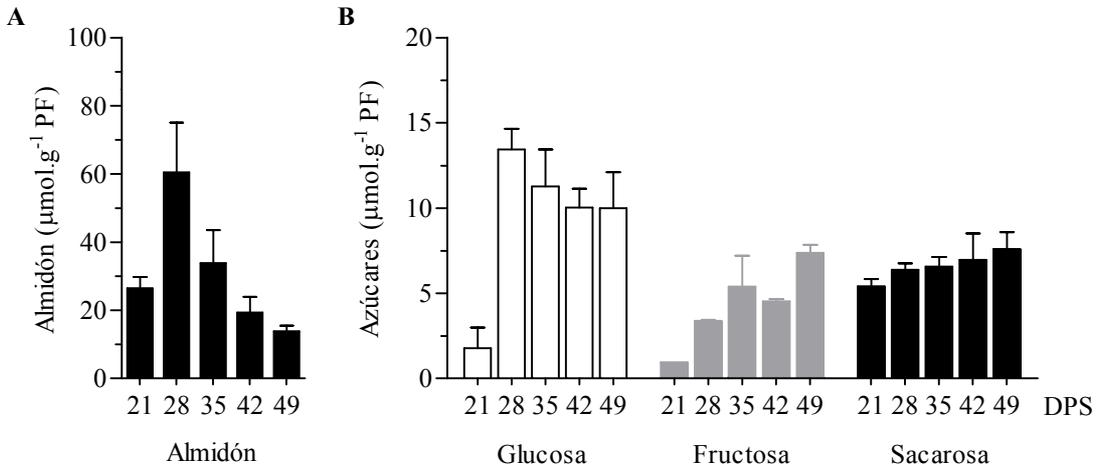


Figura 31. Contenido de azúcares en hojas de *P. vulgaris* a lo largo del desarrollo. Contenido de almidón (A) y azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) (B) en la 3ª y 4ª hoja trifoliada de plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno recogidas a los días después de la siembra (DPS) indicados. Los resultados que se muestran son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

4.3. Efecto de los ciclos de luz y oscuridad en el contenido de ureidos en *P. vulgaris*

Para estudiar si el metabolismo de los ureidos está sujeto a oscilaciones durante los ciclos de luz y oscuridad, se determinaron los niveles de ureidos en hojas de plantas de judía cultivadas con un fotoperiodo de 16 horas de luz (08:00 - 24:00) y 8 horas de oscuridad (0:01 - 07:59) a lo largo de varios días consecutivos. Se analizaron muestras de la 3ª y 4ª hoja trifoliada de plantas de judía de 28 – 30 DPS cultivadas en condiciones de FBN.

Como se muestra en la figura 32, el contenido de ureidos en hojas sufrió sólo pequeñas oscilaciones a lo largo de los tres días analizados, observándose niveles de ureidos similares en la fase de luz y en la de oscuridad del fotoperiodo.

4.4. Efecto de la oscuridad en el contenido de ureidos en *P. vulgaris*#

Como se mostró en el apartado anterior, los niveles de ureidos en hojas de plantas noduladas de judía no sufrieron cambios significativos tras 8 horas en oscuridad (ciclo de oscuridad del fotoperiodo). Para determinar si un mayor tiempo sin

iluminación podía dar lugar a cambios superiores en los niveles de ureidos, se midió el contenido de ureidos tras someter a plantas de judía a 24 y 48 horas en oscuridad (Figura 33). Para ello, plantas noduladas de judía de 28 DPS cultivadas en condiciones de luz normales (fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) se dividieron en 2 grupos equivalentes. Uno de los grupos de plantas se mantuvo en condiciones de luz estándar (plantas control), mientras que el otro se trasladó durante 48 horas a una cámara de cultivo sin iluminación. Trascurrido este tiempo, las plantas mantenidas durante 48 horas en oscuridad se devolvieron a las condiciones de luz normales durante 24 horas. De estas plantas se recogieron muestras de la 3ª y 4ª hoja trifoliada y de tallos, antes (0) y después (24 y 48 horas de oscuridad) del tratamiento de oscuridad, así como transcurridas 24 horas tras devolver las plantas que habían sido sometidas a 48 horas de oscuridad a las condiciones de iluminación normales. #

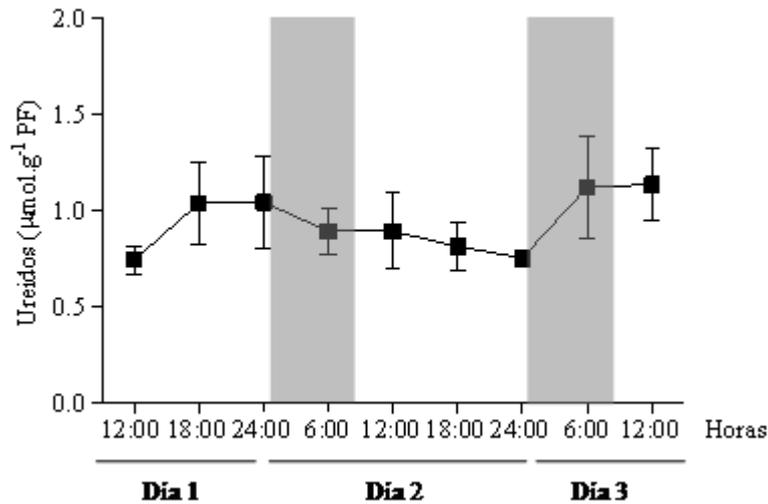


Figura 32. Contenido de ureidos en hojas de *P. vulgaris* durante las fases de luz y de oscuridad del fotoperiodo. Contenido en ureidos (alantoína y alantoato) en muestras de la 3ª y 4ª hoja trifoliada de plantas noduladas cultivadas con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (sombreado en gris) recogidas entre los 28 y los 30 días tras la siembra. Las muestras se tomaron cada 6 horas a las horas indicadas en la parte inferior de la gráfica. Los datos que se muestran son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

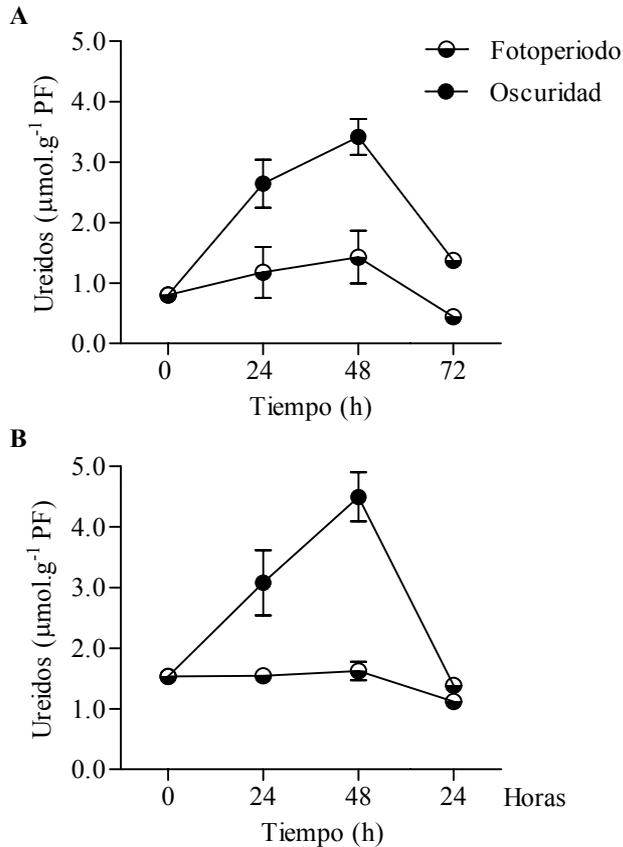


Figura 33. Efecto de la oscuridad sobre el contenido de ureidos. Plantas noduladas de 28 DPS y cultivadas con un fotoperiodo normal (◐), se transfirieron a condiciones de oscuridad durante 48 h (◑) y nuevamente a fotoperiodo normal. Cada 24 horas se tomaron muestras de las 3ª y 4ª hoja trifoliada (A) y de tallos (B) en las que se determinó su contenido en ureidos (alantoína más alantoato). Los datos que se muestran son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

Como se muestra en la figura 33, tanto en hojas como en tallos, el contenido de ureidos (principalmente alantoato) se duplicó y cuadruplicó tras 24 y 48 horas de oscuridad, respectivamente. Además, la concentración de ureidos en las hojas y tallos de las plantas mantenidas durante 48 horas en oscuridad disminuyó tras permanecer 24 h en condiciones de iluminación normales.

4.5. Regulación del metabolismo de los ureidos en condiciones de oscuridad parcial en judía

Dado que los niveles de ureidos en un tejido dependen de una suma de factores (síntesis, degradación y transporte), para determinar cuál era el origen del incremento de ureidos observado en plantas de judía sometidas a oscuridad (Figura 33), se analizaron los niveles de ureidos en plantas en las que sólo parte de las hojas se habían sometido a condiciones de oscuridad (oscuridad parcial). Con este fin, se cubrieron con papel de aluminio el 50% de las hojas trifoliadas de plantas noduladas de judía, cultivadas en condiciones de luz normales durante 4 semanas, y se mantuvieron en estas condiciones durante 48 horas (plantas tratadas). Transcurrido este tiempo, se recogieron muestras de las hojas sometidas a oscuridad (hojas cubiertas), de las hojas no cubiertas y de los tallos de las plantas tratadas, así como de las hojas trifoliadas (hojas control) y los tallos de plantas noduladas de judía de la misma edad cuyas hojas no habían sido cubiertas con papel de aluminio (plantas control).

El contenido de ureidos aumentó en las hojas iluminadas de las plantas que habían tenido un 50% de sus hojas sometidas a oscuridad durante 48 h (Figura 34, A), alcanzándose valores similares a los observados en hojas de plantas que se habían mantenido durante 48 horas en oscuridad total (Figura 33, A). Por el contrario, en las hojas sometidas a oscuridad de las plantas tratadas se encontraron niveles de ureidos inferiores a los observados en las hojas que no habían sido cubiertas de estas mismas plantas, e incluso a los observados en hojas trifoliadas de las plantas control (Figura 34, A). Asimismo, los niveles de ureidos fueron superiores en tallos de las plantas tratadas que en los de las plantas control (Figura 34, B), aunque menores a los encontrados en tallos de plantas mantenidas durante 48 horas en oscuridad total (Figura 33, B).

En las mismas muestras donde se midió el contenido de ureidos, se determinaron también las actividades enzimáticas que catalizan la síntesis y degradación del alantoato. En hojas, los mayores valores de actividad alantoinasa

se encontraron en las hojas iluminadas de las plantas tratadas, con valores 2 veces superiores a los observados tanto en las hojas cubiertas de estas plantas como en las hojas de las plantas control (Figura 35, A). Asimismo, los mayores valores de actividad alantoinasa se observaron en los tallos procedentes de las plantas tratadas (Figura 35, B).

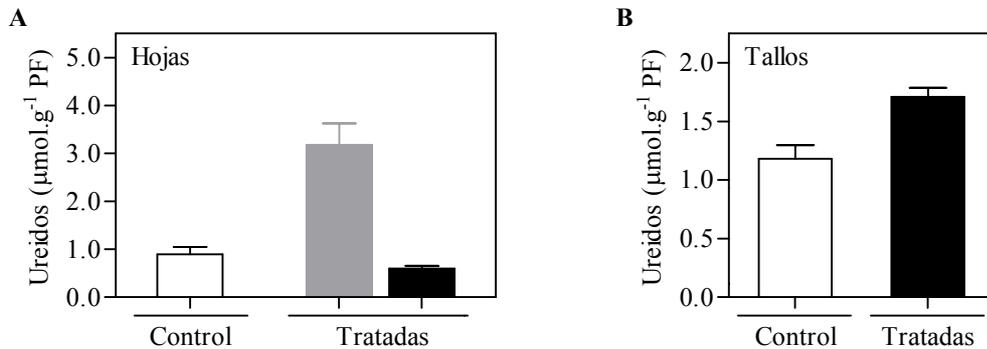


Figura 34. Contenido de ureidos en plantas noduladas de judía sometidas a oscuridad parcial. La mitad de las hojas trifoliadas de plantas de 28 días tras la siembra se cubrieron con papel de aluminio durante 48 h (tratadas), transcurridas las cuales se midió el contenido en ureidos (alantoína más alantoato) en hojas (A) cubiertas (barras negras) y no cubiertas (barras grises) y en tallos (B) de esas plantas. Como control se usaron plantas cultivadas en FBN de la misma edad que no se sometieron a oscuridad parcial (barras blancas). Los datos que se muestran son la media y desviación estándar de los resultados obtenidos en 4 experimentos independientes.

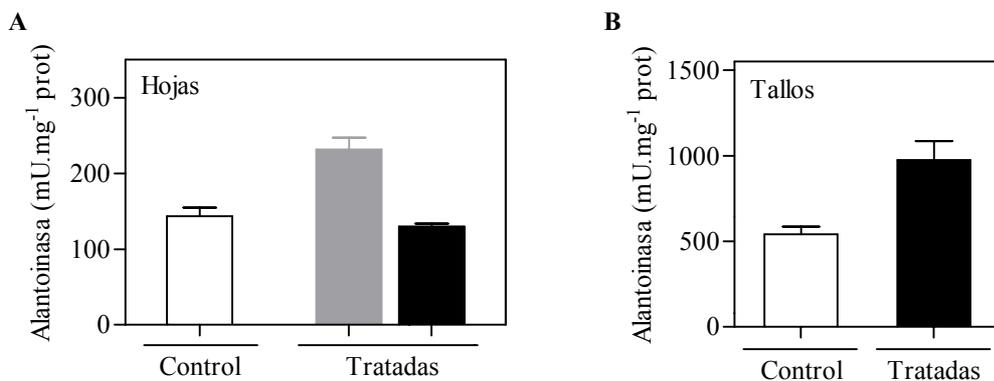


Figura 35. Actividad alantoinasa en plantas noduladas de judía sometidas a oscuridad parcial. La mitad de las hojas trifoliadas de plantas noduladas de 28 DPS se cubrieron con papel de aluminio durante 48 h (tratadas), transcurridas las cuales se midió la actividad alantoinasa en hojas (A) cubiertas (barras grises) y no cubiertas (barras negras) y en tallos (B) de esas plantas. Con barras blancas se muestran los valores de plantas control. Los datos que se muestran son la media y desviación estándar de los resultados obtenidos en 4 experimentos independientes.

En hojas sometidas a oscuridad (hojas cubiertas) de las plantas tratadas se observó un descenso en la actividad AAH con respecto a la de las hojas iluminadas (hojas no cubiertas) y a la de las plantas control. Además, en las hojas iluminadas de las plantas tratadas se observaron niveles de actividad inferiores a los encontrados en las hojas de las plantas control (Figura 36, A). Por su parte, la actividad PH-alcasa fue similar en las muestras de hojas procedentes de plantas tratadas y de plantas control (Figura 36, B).

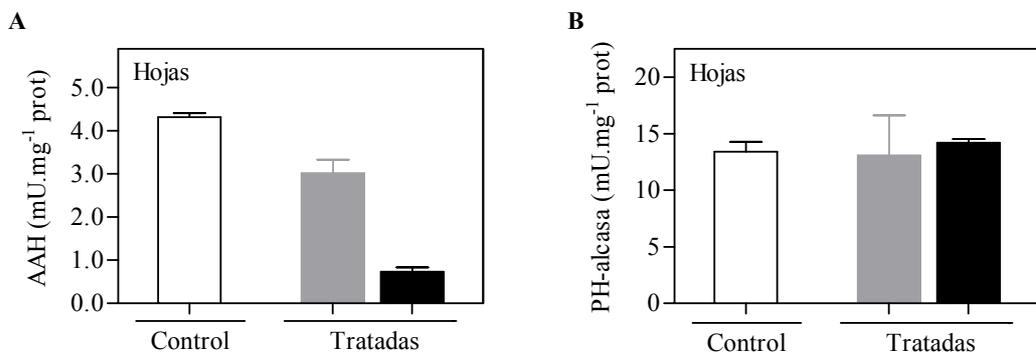


Figura 36. Actividades catalizadoras de la degradación del alantoato en hojas trifoliadas de plantas de judía sometidas a oscuridad parcial. El 50% de las hojas trifoliadas de plantas noduladas de judía de 4 semanas de edad se cubrieron con papel de aluminio durante 48 horas (Plantas tratadas), tras las cuales se recogieron muestras de hojas cubiertas (barras negras), no cubiertas (barras grises) y en las cuales se determinaron las actividades AAH (A) y PH-alcasa (B). Las barras blancas representan plantas control. Los datos mostrados son la media de 4 experimentos independientes.

4.6. Fijación de nitrógeno en plantas de judía sometidas a oscuridad parcial

Para determinar cómo afecta la reducción de la capacidad fotosintética inducida en las plantas sometidas a oscuridad parcial (con el 50% de las hojas cubiertas) a la fijación de nitrógeno, se determinó la tasa de fijación de nitrógeno, así como el peso fresco y el contenido de ureidos de los nódulos de esas plantas.

Como se muestra en la figura 37, la tasa de fijación de nitrógeno, medida como ANA y ANT, y el peso fresco de nódulos por planta fueron menores en las plantas tratadas que en las plantas control; en cambio, el contenido de ureidos de los nódulos descendió solo ligeramente en las plantas tratadas.

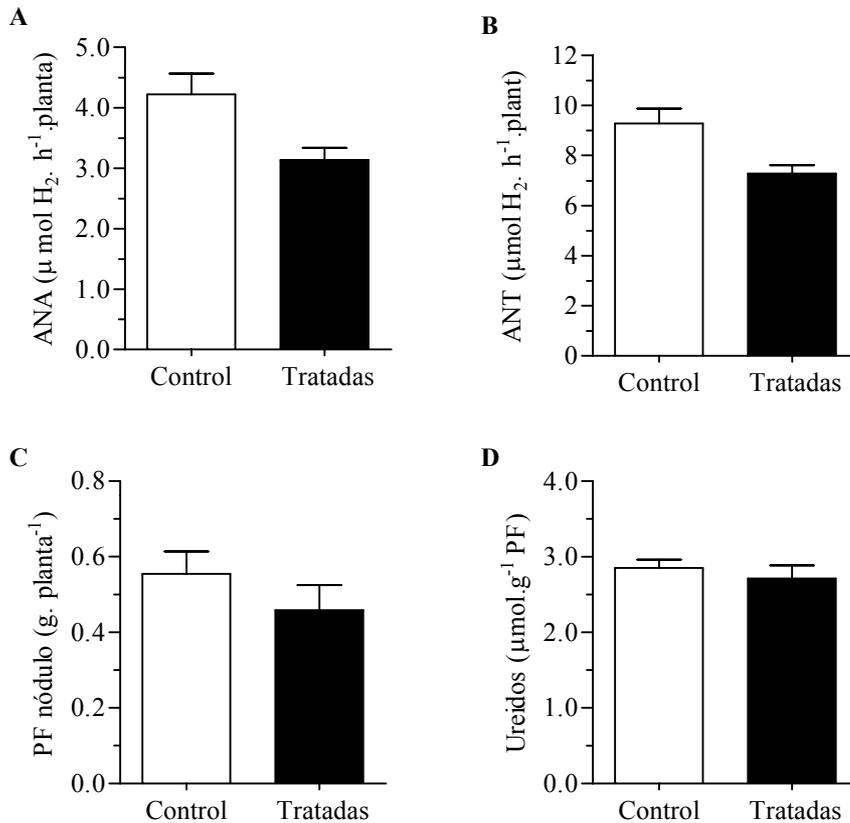


Figura 37. Tasa de fijación de nitrógeno, peso fresco y contenido de ureídos en nódulos en plantas de judía sometidas a oscuridad parcial. Se analizaron muestras de plantas noduladas de judía de 4 semanas de edad mantenidas durante 48 horas con el 50% de las hojas trifoliadas cubiertas con papel de aluminio (Plantas tratadas, en negro) y plantas noduladas de la misma edad cultivadas en condiciones de luz normales (Plantas control, en blanco). La fijación de nitrógeno se determinó como actividad nitrogenasa aparente (ANA) y actividad nitrogenasa total (ANT). El contenido de ureídos es la suma de alantoína y alantoato. Los datos que se presentan son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

4.7. Cambios en los niveles de carbohidratos en hojas de plantas de judía sometidas a oscuridad parcial

Como se ha mencionado en el apartado 4.2 de Resultados, se observó un incremento de carbohidratos durante la transición de la fase vegetativa a la reproductiva en plantas noduladas que coincidía con un incremento en los niveles de ureídos (Figura 19). Para determinar si en plantas sometidas a oscuridad parcial se producían también cambios en el contenido de azúcares, se midieron los niveles de carbohidratos en hojas trifoliadas. Se observó un incremento en el contenido de

glucosa en las hojas cubiertas de las plantas tratadas con respecto a las hojas no cubiertas y a las hojas de las plantas control (Figura 38, B). Por el contrario, se observó un descenso en los niveles de almidón y sacarosa (Figura 38, A y D) en las hojas de las plantas tratadas, en especial en las hojas cubiertas, mientras que el contenido en fructosa no cambió significativamente (Figura 38, C).

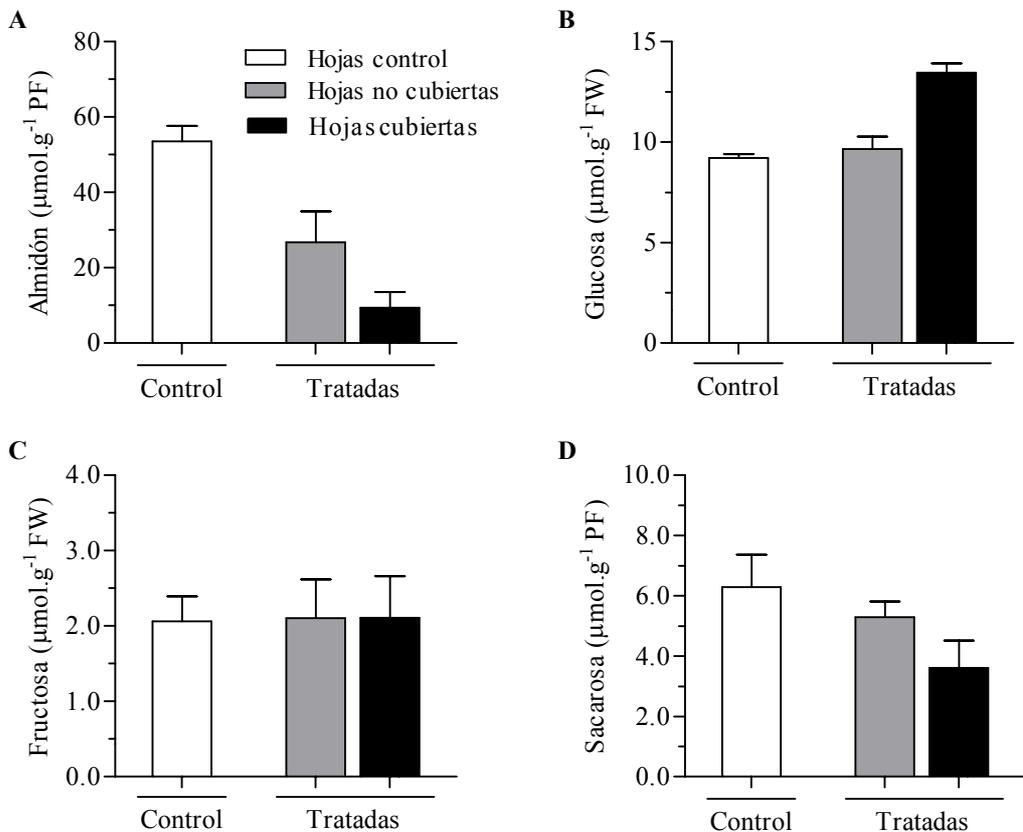


Figura 38. Contenido de carbohidratos en hojas trifoliadas de plantas de judía mantenidas en oscuridad parcial. Se midió el contenido en almidón (A), glucosa (B), fructosa (C) y sacarosa (D). El 50% de las hojas trifoliadas de plantas noduladas de judía de 4 semanas de edad se cubrieron con papel de aluminio y se mantuvieron en oscuridad durante 48 horas (Plantas tratadas). Se recogieron muestras de hojas cubiertas (barras negras), hojas no cubiertas (barras grises) y de tallos (barras negras) Las barras blancas representan plantas control. Los datos mostrados son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

4.8. Regulación del catabolismo del alantoato en *P. vulgaris* por estrés hídrico

Numerosos autores han descrito que en condiciones de déficit hídrico se produce una acumulación de ureidos, principalmente alantoato, en las leguminosas ureídicas como soja o judía. Además, la acumulación de estos compuestos se ha relacionado con la inhibición de la fijación de nitrógeno observada en condiciones de sequía (Serraj *et al.*, 1999b; King y Purcell, 2005) y se ha sugerido que el aumento en los niveles de alantoato estaría causado por una menor capacidad de degradación del alantoato en estas condiciones (Vadez y Sinclair, 2000; Vadez *et al.*, 2000). Para determinar si la disminución del catabolismo del alantoato es la causa del incremento de su concentración, se determinó la capacidad de degradar alantoato en plantas de judía sometidas a déficit hídrico. Para ello, plantas de judía de 4 semanas de edad cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno se dividieron en dos grupos equivalentes. Uno de los grupos de plantas se mantuvo con irrigación normal (3 riegos por semana), mientras que el otro grupo dejó de regarse. A los 10 días de comenzar el tratamiento (38 DPS), se analizaron las actividades catalizadoras de la degradación del alantoato en muestras de la 3ª y 4ª hoja trifoliada tanto de las plantas tratadas como de las plantas control.

Como se muestra en la figura 39, A, se encontró un descenso en la actividad AAH en hojas de plantas sometidas a déficit hídrico, con valores de actividad por debajo del 50% de los observados en hojas de las plantas control. Por el contrario, la actividad PH-alcasa fue similar en las muestras procedentes de plantas tratadas y de plantas control (Figura 39, B).

4.9. Regulación de la expresión del gen *PvAAH* por ABA, JA, SA y choque térmico

Como se indica en el apartado 1.4 de Resultados, en la región promotora del gen *PvAAH* existen diversas secuencias que podrían participar en la regulación de la transcripción. Entre otros, hay motivos de regulación de la transcripción por

hormonas, choque térmico y por baja temperatura. Para verificar si la expresión del gen *PvAAH* podría estar regulada por alguno de estos factores, como una primera aproximación experimental, se trataron plantas de judía con algunas de estas sustancias reguladoras.

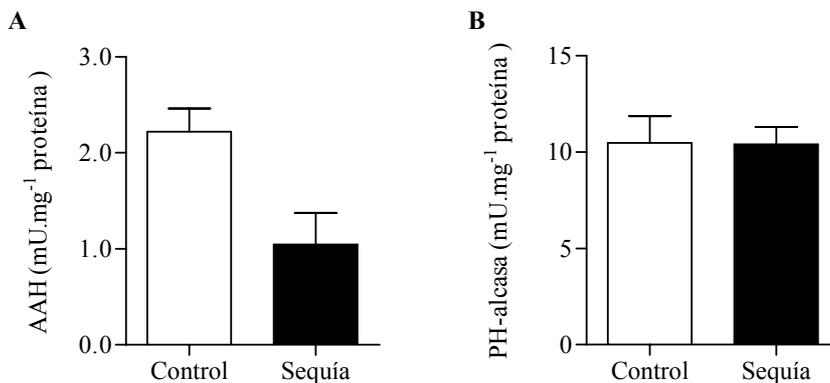


Figura 39. Actividades catalizadoras de la degradación del alantoato en hojas trifoliadas de *P. vulgaris* en respuesta al estrés hídrico. La actividad AAH (A) y PH-alcasa (B) se muestran en mU por miligramo de proteína. Se analizaron muestras de la 3^a y 4^a hoja trifoliada de plantas noduladas de judía regadas con regularidad (barras blancas) y mantenidas durante 10 días sin riego (barras negras). Estos resultados son la media y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

En primer lugar, se estudió el papel regulador del ácido abscísico (ABA), jasmonato (JA) y ácido salicílico (SA) sobre la expresión del gen *PvAAH*. Para ello, tanto las hojas como las raíces de plantas noduladas de judía de 19 DPS se trataron con diferentes soluciones que contenían ABA (10 μ M), JA (50 μ M) o SA (200 μ M) cada 24 h. A las 48 h del inicio del tratamiento, se recogieron muestras de la 3^a y 4^a hoja trifoliada de las plantas tratadas y de plantas control y se analizó la expresión del gen *PvAAH* mediante RT-PCR cuantitativa. También se analizó la expresión del gen *PvAAH* en condiciones de baja temperatura (4 °C) y por choque térmico (39 °C), para lo cual se cortaron hojas trifoliadas de plantas noduladas de judía de 21 DPS y se incubaron durante 4 horas a 4 °C o 2 horas a 39 °C. Como control de los tratamientos de choque térmico y baja temperatura se usaron hojas trifoliadas de plantas noduladas de judía de la misma edad incubadas a temperatura

ambiente durante 2 y 4 horas, respectivamente. Para estos tratamientos de temperatura, las hojas cortadas se incubaron sobre papel humedecido para evitar su desecación.

Como se muestra en la figura 40, la expresión del gen *PvAAH* se duplicó en las plantas tratadas con JA y SA, mientras que el ABA produjo sólo un ligero incremento. La expresión del gen también aumentó en las hojas sometidas a choque térmico y descendió en las muestras incubadas a 4 °C.

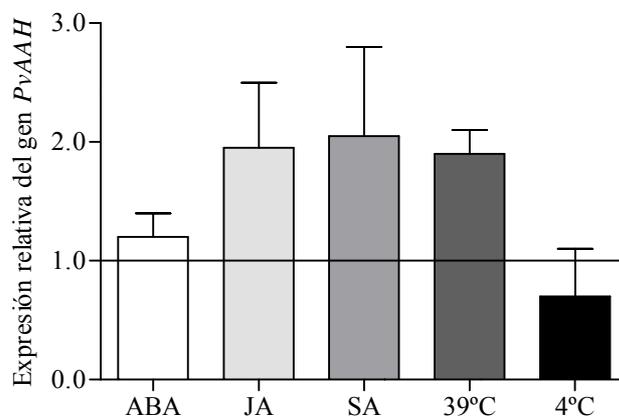


Figura 40. Cambios en la expresión del gen *PvAAH* por ABA, JA, SA, choque térmico y baja temperaturas en *P. vulgaris*. La expresión del gen *PvAAH* se hizo relativa a su expresión en cada una de las muestras control (línea negra). Se analizaron muestras de la 3ª y 4ª hojas trifoliadas de plantas noduladas de judía tratadas con ABA (10 µM), JA (50 µM) y SA (200 µM) durante 48 horas, así como sometidas a estrés por choque térmico (2 h a 39 °C) y baja temperatura (4 h a 4 °C). Los datos se normalizaron frente a la expresión del gen de la *Actina 2* en cada una de las muestras. Estos resultados son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

En las muestras donde se había determinado la expresión del gen *PvAAH* se midieron también los niveles de ureidos (alantoína y alantoato). Se encontró un menor contenido de alantoato en las muestras tratadas con ABA, JA, SA y sometidas a estrés por choque térmico que en las muestras de plantas control. Por el contrario, el contenido de alantoína fue similar en todos los tratamientos (Figura 41).

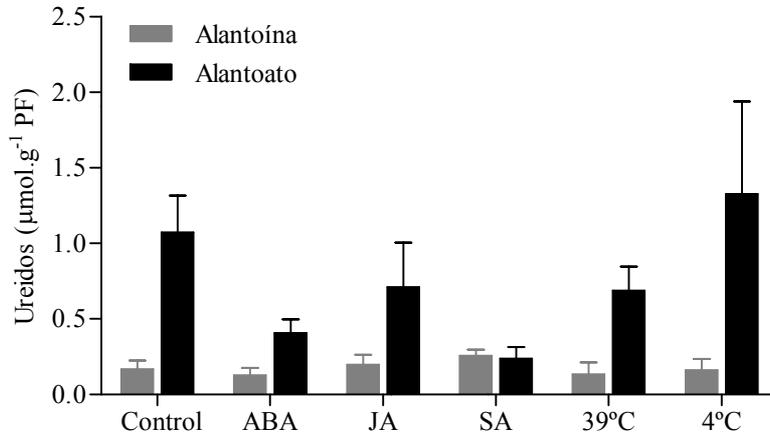


Figura 41. Cambios en el contenido de ureidos por ABA, JA, SA, choque térmico y baja temperaturas en hojas de *P. vulgaris*. Se analizaron muestras de la 3^a y 4^a hoja trifoliada de plantas noduladas de judía tratadas con ABA (10 µM), JA (50 µM) y SA (200 µM) durante 48 horas, así como sometidas a estrés por choque térmico (2 h a 39 °C) y baja temperatura (4 h a 4 °C). Estos resultados son la media y desviación estándar de 4 experimentos independientes.

V. DISCUSIÓN

1. Identificación del gen de la enzima alantoato amidohidrolasa de judía

Hasta hace relativamente poco tiempo, la información que existía acerca de los genes y enzimas involucrados en la degradación del alantoato en plantas era muy limitada. Sin embargo, la publicación del genoma de gran número de plantas y el desarrollo de métodos no convencionales que permiten la purificación rápida y eficiente de proteínas han permitido, en pocos años, aumentar de forma considerable el conocimiento acerca de esta ruta bioquímica en plantas (Revisado por Werner y Witte, 2011). No obstante, mientras que en *Arabidopsis* ya parece claro que la degradación del alantoato está catalizada por la enzima alantoato amidohidrolasa (Todd y Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008), en plantas como las leguminosas ureídicas, donde los ureidos son mucho más abundantes, aún no se ha demostrado si esta etapa del catabolismo de los ureidos está mediada por una (alantoato amidohidrolasa) o varias enzimas (alantoato amidohidrolasa y alantoicasa). Asimismo, los intentos por determinar qué enzimas están implicadas en la degradación del alantoato usando aproximaciones fisiológicas y técnicas bioquímicas convencionales han dado resultados controvertidos e incluso contradictorios (Shelp y Ireland, 1985; Winkler *et al.*, 1987; Stebbins y Polacco, 1995; Vadez y Sinclair, 2000; Todd y Polacco, 2004).

En este trabajo se ha identificado y clonado un ADNc de judía (*PvAAH*) que codifica una proteína con una alta homología con las alantoato amidohidrolasas (AAHs) descritas en plantas (Todd y Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008) y en bacterias (Schultz *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2007). Además, esta proteína presenta todos los aminoácidos necesarios para la unión al sustrato y a los cofactores e iones metálicos descritos en la AAH de *E. coli* (Agarwal *et al.*, 2007), y que están conservados también en las AAHs de *Arabidopsis* (Todd y Polacco, 2006) y soja (Werner *et al.*, 2008) (Figura 4). Estos resultados indican que el ADNc *PvAAH* codifica una alantoato amidohidrolasa.

El análisis por Southern blot mostró que en el genoma de judía hay un único gen *PvAAH* (Figura 5), que se encuentra organizado en 12 exones y 11

intrones (Figura 6). Estos resultados se han confirmado gracias a la reciente publicación del genoma de *Phaseolus vulgaris* (<http://www.phytozome.net>). En judía, como en la mayoría de las plantas cuyos genomas se han secuenciado, el gen *AAH* es de copia única, al igual que los genes que codifican las enzimas que continúan tras la degradación del alantoato (ureidoglicina aminohidrolasa y ureidoglicolato amidohidrolasa) (Witte, 2011). Por el contrario, en soja se han identificado dos copias del gen de la enzima alantoato amidohidrolasa, de acuerdo con la reciente duplicación que sufrió el genoma de esta planta (Shoemaker *et al.*, 1996). De hecho, la gran mayoría de los genes están representados por el doble de copias en soja que en especies muy relacionadas, como judía. Esto mismo ocurre con el gen de la alantoinasa, del que existen dos copias en el genoma de judía (Díaz-Leal *et al.*, 2012) y cuatro en el de soja (Duran y Todd, 2012). Originariamente, en *Arabidopsis* también hubo dos genes anotados como alantoato amidohidrolasa (*AtAAH-1* y *AtAAH-2*). No obstante, estudios posteriores han mostrado que el gen *AtAAH-2* codifica en realidad una ureidoglicolato amidohidrolasa (Werner *et al.*, 2010).

La búsqueda en las bases de datos reveló la existencia de proteínas similares a la AAH de judía en la mayor parte de las plantas cuyos genomas se han publicado, así como en varios géneros de bacterias (Figura 3). Por el contrario, en ninguno de estos organismos se han encontrado secuencias que pudieran codificar la enzima alantoicasa. Por su parte, en organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Homo sapiens* o *Xenopus laevis*, donde se ha identificado la enzima alantoicasa, no se encuentran secuencias similares a las AAHs de plantas o bacterias (Ramazzina *et al.*, 2008; Witte, 2011). Una excepción parece ser el caso de *Chlamydomonas reinhardtii*, en cuyo genoma se ha encontrado una secuencia homóloga a las AAHs, pero no a la alantoicasa, a pesar de que es el único organismo fotosintético del que se ha purificado y caracterizado una proteína que exhibe las propiedades moleculares y catalíticas típicas de las alantoicasas. La existencia de secuencias codificantes para una u otra enzima

sugiere que se ha producido una divergencia evolutiva en la ruta de degradación del alantoato, de manera que en los organismos antes mencionados poseen sólo una de las dos vías. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en *Saccharomyces cerevisiae*, cuyos mutantes deficientes en la actividad alantoicaasa eran incapaces de crecer usando alantoato como única fuente de nitrógeno (Lawther *et al.*, 1974), así como con los obtenidos en soja, usando inhibidores de ureasas y cultivares mutantes carentes de actividad ureasa (Stebbins y Polacco, 1995), y en *Arabidopsis*, donde mutantes que carecían de la actividad alantoato amidohidrolasa eran incapaces de crecer en medios con alantoato como única fuente de nitrógeno (Todd y Polacco, 2006).

La reciente publicación de los genomas de soja (Schmutz *et al.*, 2010) y de judía (<http://www.phytozome.net>) ha permitido comparar las regiones promotoras de algunos de los genes que participan en la síntesis y degradación del alantoato. Al igual que en el promotor del gen *PvAAH* (Figura 7), en las regiones promotoras de los genes de las enzimas uricasa y alantoinasa de judía y de soja se reconocen varios motivos de posible regulación por luz, por diferentes hormonas y por estrés biótico y abiótico. Estos resultados sugieren una relación entre el metabolismo de los ureidos y la respuesta a múltiples factores ambientales y de estrés, lo que está de acuerdo con los cambios en el metabolismo de los ureidos observados en diferentes situaciones de estrés tanto en plantas leguminosas (Serraj *et al.*, 1999b; Alamillo *et al.*, 2010), como en plantas no leguminosas (Yesbergenova *et al.*, 2005; Brychkova *et al.*, 2008).

2. Caracterización bioquímica de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep y determinación de la actividad alantoato amidohidrolasa en tejidos de judía

En el trabajo que aquí se presenta se ha llevado a cabo la caracterización bioquímica de la enzima alantoato amidohidrolasa identificada en judía (Figuras 2 y 4). Para ello, se llevó a cabo la sobreexpresión en bacterias de esta proteína

fusionada a una marca para su purificación. No obstante, al igual que ocurría con la AAH de *Arabidopsis* (Serventi *et al.*, 2010), la proteína sobreexpresada en bacterias no era soluble en condiciones nativas. Para poder determinar las características bioquímicas de la AAH de judía, se optó por la sobreexpresión en plantas, siguiendo el método usado por Werner y col. (2008) para purificar las AAHs de *Arabidopsis* y soja. La proteína PvAAH expresada en *Nicotiana benthamiana* se purificó de forma fácil y rápida mediante la unión del epítipo StrepII a una resina de afinidad (Witte *et al.*, 2004) (Figura 10) y dio lugar a una proteína recombinante activa (Figura 11).

Al igual que las AAHs descritas en *Arabidopsis* y soja, la proteína PvAAH-HA-Strep utiliza alantoato como sustrato, pero no ureidoglicolato. En cambio, se ha descrito que la enzima alantoicasa (alantoato amidinohidrolasa) puede catalizar tanto la degradación de alantoato a ureidoglicolato como de este a glioxilato, lo que es típico de las alantoicasas (Gravenmade *et al.*, 1970; Vogels y van der Drift, 1976; Piedras *et al.*, 2000).

Recientemente, varios trabajos (Serventi *et al.*, 2010; Werner *et al.*, 2010) han demostrado que los productos de la reacción catalizada por las AAHs, tanto de *Arabidopsis* como de *E. coli*, son ureidoglicina, CO₂ y amonio. Estos autores observaron que la ureidoglicina que se producía enzimáticamente en esta reacción, se descomponía rápidamente a amonio, urea y glioxilato. Por tanto, en las condiciones de ensayo usadas por estos autores (muy similares a las usadas en este trabajo de tesis), en lugar de detectar 1 mol de amonio y 1 mol de ureidoglicina por cada mol de alantoato, se detectaban 2 moles de amonio, 1 mol de urea y 1 mol de glioxilato por cada mol de alantoato. Al igual que en las reacción de las AAHs de *Arabidopsis* y *E. coli* (Werner *et al.*, 2008 y 2010; Serventi *et al.*, 2010), en la reacción catalizada por la enzima PvAAH-HA-Strep se obtuvo una relación en la producción de amonio:glioxilato de 2:1, o 4:1 si se añadía ureasa antes de la determinación de amonio (Figura 11), confirmándose así que la enzima

caracterizada en este trabajo es una alantoato amidohidrolasa, que cataliza la degradación del alantoato a ureidoglicina, amonio y CO₂.

La enzima PvAAH-HA-Strep mostró la mayor actividad a pH 8 (Figura 13, A), al igual que las AAHs de soja (Winkler *et al.*, 1985) y de *Bacillus fastidiosus* (Xu *et al.*, 1995b). Asimismo, en el trabajo de Lukaszewski y col. (1992) y en la caracterización de las AAHs de *Arabidopsis* y soja (Werner *et al.*, 2008) se emplean tampones con valores de pH 8. Por el contrario, la actividad catalizadora de la degradación de alantoato anteriormente caracterizada en judía (PH-alcasa) presenta a pH 8 una reducción del 50% en su actividad (Raso *et al.*, 2007a).

La actividad de la proteína PvAAH-HA-Strep fue máxima a una temperatura de aproximadamente 40 °C (Figura 13, B). Estos resultados son similares a los descritos para la AAH de *Bacillus fastidiosus* (Xu *et al.*, 1995b) y para la actividad PH-alcasa de judía (Raso *et al.*, 2007a).

La extracción y purificación de la proteína recombinante PvAAH-HA-Strep activa, al igual que las AAHs de *Arabidopsis* y soja (Werner *et al.*, 2008), requirió la presencia de una concentración elevada de DTT en los tampones de trabajo, de forma que una disminución de 15 mM a 2 mM en la concentración de DTT produjo una reducción del 80% en la actividad de esta proteína. De forma similar, Winkler y col. (1985) y Lukaszewski y col. (1992) usaron altas concentraciones de β-mercaptoetanol para la determinación de la actividad AAH en extractos de semillas y hojas de soja. También la actividad de la AAH de *Bacillus fastidiosus* aumentó en presencia de glutatión (Xu *et al.*, 1995b). Por el contrario, la presencia de DTT no tuvo ningún efecto sobre la actividad PH-alcasa de judía (Raso *et al.*, 2007a).

El efecto positivo del DTT sobre la actividad de la proteína PvAAH-HA-Strep sugiere que esta enzima requiere grupos-SH reducidos para su actividad y, por tanto, es sensible a la inhibición por oxidación. Esto podría estar relacionado con la inhibición de la actividad de la proteína PvAAH-HA-Strep por glioxilato, en ausencia de agentes reductores (Figura 15). No obstante, el efecto de agentes

reductores u oxidantes sobre la actividad AAH, que podría ser relevante para la regulación post-transcripcional de la proteína, aún está pendiente de una demostración experimental.

La proteína PvAAH-HA-Strep mostró mayor nivel de actividad en presencia de manganeso, mientras que se inhibió por zinc y EDTA (Tabla 5). Estas características son comunes en todas las AAHs descritas tanto en plantas como en bacterias (Vogels, 1966; Winkler *et al.*, 1985; Lukaszewski *et al.*, 1992; Werner *et al.*, 2008), así como en algunas otras enzimas de la ruta (Serventi *et al.*, 2010). Por su parte, también la actividad PH-alcasa mostró activación por manganeso e inhibición por EDTA aunque, a diferencia de la PvAAH, esta enzima no mostró inhibición por zinc (Raso *et al.*, 2007a). La activación por manganeso junto con el efecto inhibitor del EDTA sugieren que la AAH es una metaloenzima que probablemente contenga manganeso, de acuerdo con las conclusiones de Werner y col. (2008) para las AAHs de *Arabidopsis* y soja.

Para la proteína PvAAH-HA-Strep se determinó una K_m de 0,46 mM para el alantoato (Figura 14). Este valor está en un rango de concentración similar al de la actividad AAH de semillas de soja (Winkler *et al.*, 1985) (1 mM), así como al valor de K_m (1,7 mM) para la siguiente enzima de esta ruta, la ureidoglicina aminohidrolasa de *Arabidopsis* (Shin *et al.*, 2012). El valor de K_m de la PvAAH es más alto que el descrito para las AAHs de soja y *Arabidopsis* (0,08 y 0,03 mM, respectivamente) (Werner *et al.*, 2008). Sin embargo, mucho mayor fue la K_m determinada anteriormente para la actividad PH-alcasa de judía, con valores de K_m entre 2,5 y 6,6 mM para concentraciones de fenilhidrazina de 0,2 y 0,4 mM, respectivamente (Raso *et al.*, 2007a).

Como ya se ha mencionado, con anterioridad a este trabajo, Raso y col. (2007a) purificaron parcialmente, mediante técnicas bioquímicas convencionales, una proteína capaz de catalizar la degradación de alantoato a partir de frutos de judía (PH-alcasa). Estos autores observaron que para poder determinar esta actividad enzimática era imprescindible la presencia de fenilhidrazina y que en la

reacción se producía ureidoglicolato estequiométricamente con el alantoato pero no detectaban urea y sólo una pequeña fracción de amonio (10 – 12% del ureidoglicolato), lo que no concuerda con la estequiometría esperada para una actividad alantoato amidohidrolasa ni para una actividad alantoicasa. Para comprobar si la enzima PvAAH era la responsable de la actividad caracterizada por Raso y col. (2007a), se determinaron las actividades AAH y PH-alcasa durante la purificación de la proteína PvAAH-HA-Strep (Figura 12). En estos ensayos, la actividad PH-alcasa sólo se encontró en el extracto crudo y en la fracción recogida tras el primer lavado de la resina, mientras la actividad AAH se detectó en el extracto crudo y en la fracción donde se encontraba la proteína PvAAH-HA-Strep purificada. Estos resultados indican que la proteína PvAAH no es la responsable de la actividad PH-alcasa descrita por Raso y col. (2007a), lo que justifica las diferentes características bioquímicas que presentan ambas actividades enzimáticas, así como las diferencias observadas entre el patrón de expresión del gen *PvAAH* y los niveles de la actividad PH-alcasa (Figuras 17 y 18).

En extractos de raíces, tallos y hojas de plantas de judía se detectó una actividad enzimática capaz de catalizar la degradación del alantoato con producción directa de amonio en la reacción y con características similares a la proteína PvAAH-HA-Strep (Figura 16). Estos resultados coinciden con los obtenidos con la proteína PvAAH-HA-Strep pura (Figura 11) y con las AAHs de *A. thaliana* y *E. coli* (Werner *et al.*, 2008; 2010; Serventi *et al.*, 2010). Además, el análisis de la expresión del gen *PvAAH* en raíces, tallos y hojas de plantas noduladas de judía (Figura 17, C), así como en las raíces pilosas donde se había silenciado la expresión de este gen (Figura 18, A y B), mostró una clara correlación entre los niveles de esta actividad enzimática y la expresión del gen *PvAAH*. Todo esto indica que la degradación del alantoato en diferentes tejidos de judía está catalizada, al menos mayoritariamente, por la enzima alantoato amidohidrolasa, codificada por el gen *PvAAH*.

3. Silenciamiento génico del gen *PvAAH* en judía

A pesar de las dificultades encontradas para estudiar las enzimas involucradas en la degradación del alantoato en plantas (inestabilidad de las enzimas y de sus productos, controvertidos estudios fisiológicos y bioquímicos, entre otras), varios trabajos recientes en *A. thaliana* indican que, al menos en esta planta, la degradación del alantoato se lleva a cabo con producción directa de amonio, vía alantoato amidohidrolasa, ureidoglicina aminohidrolasa y ureidoglicolato amidohidrolasa (Todd y Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008; Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010). No obstante, en leguminosas ureídicas como judía y soja, donde los ureidos tienen una especial relevancia, aún no se puede descartar que estén también involucradas otras enzimas (Todd y Polacco, 2004; Raso *et al.*, 2007a; Muñoz *et al.*, 2011).

Una de las razones por las que aún no se conocen con seguridad el número de enzimas que participan en el catabolismo del alantoato en leguminosas es la dificultad para obtener mutantes, además de los problemas que existen para la transformación genética de estas plantas (Revisado por Somers *et al.*, 2003). No obstante, en los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten la transformación de leguminosas recalcitrantes, como es la transformación de raíces de judía (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006; 2007).

En este trabajo se transformaron raíces de judía en las que se bloqueó post-transcripcionalmente la expresión del gen *PvAAH*. En estos tejidos, se observó que el descenso en la expresión del gen *PvAAH* dio lugar a un descenso también de la actividad AAH, así como a un incremento proporcional en los niveles de alantoato (Figura 18). No obstante, este cambio en los niveles de ureidos no se correlacionó con cambios en la actividad PH-alcasa, que se mantuvo constante, con niveles de actividad específica 10 veces superiores a la actividad AAH (Figura 18, C y D), lo que sugiere que *in vivo* la actividad PH-alcasa no tiene un papel relevante en la degradación del alantoato en judía.

Como se mostró en la figura 18, en las raíces pilosas se observaron elevados niveles de alantoato. Esto podría deberse a que las raíces pilosas son tejidos con un crecimiento muy rápido, donde los procesos de reciclaje en los que participa el catabolismo de los ureidos han de tener una gran importancia, al igual que ocurre en las hojas superiores (más jóvenes) de la planta y donde también se observaron altos niveles de ureidos y de actividad alantoinasa (Figura 26).

Raso y col. (2007a) mostraron que la actividad enzimática PH-alcasa era dependiente de fenilhidrazina y que este compuesto tenía un doble efecto como activador e inhibidor, según la concentración. La fenilhidrazina ha sido también usada para la determinación de otras actividades enzimáticas que inicialmente se describieron como ureidoglicolato urea-liasas (Muñoz *et al.*, 2001; 2006). En estos trabajos se postulaba que la fenilhidrazina se unía al glioxilato producido en estas reacciones, evitando la inhibición por producto de la reacción. No obstante, recientemente se ha demostrado que esta no es la función de la fenilhidrazina, sino que este compuesto actúa como cosustrato, junto con el ureidoglicolato, dando lugar a la formación de ureidoglicolato de fenilhidrazona, que se descompone espontáneamente liberando glioxilato y urea (Muñoz *et al.*, 2011). De modo parecido, una de las posibles razones que se dan para explicar la dependencia de fenilhidrazina de la actividad PH-alcasa y los bajos niveles de amonio producidos por esta reacción es que, *in vitro*, la fenilhidrazina forme un complejo con el alantoato que actúa como sustrato de esta enzima (Raso *et al.*, 2007a). Independientemente de la función de las enzimas caracterizadas por Raso y col. (2007a), Muñoz y col. (2001) y Muñoz y col. (2006), *in vitro* estas actividades requieren fenilhidrazina. Dado que la fenilhidrazina no existe en la naturaleza, Raso y col. (2007a) y, más tarde, Muñoz y col. (2011) sugirieron que *in vitro* el complejo fenilhidrazina-alantoato o la fenilhidrazina, respectivamente, actuarían sustituyendo al verdadero sustrato de estas enzimas.

Por último, el incremento de ureidos (principalmente alantoato) en las raíces pilosas de judía donde se había silenciado la expresión del gen *PvAAH*

indica que la degradación del alantoato es catalizada sólo por la enzima alantoato amidohidrolasa, al igual que se ha descrito en *Arabidopsis* (Todd y Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008). Asimismo, esta conclusión está de acuerdo con los datos bioquímicos obtenidos en soja por diferentes autores (Winkler *et al.*, 1987; Stebbins y Polacco, 1995; Todd y Polacco, 2004), así como con la falta de secuencias de nucleótidos en el genoma de judía que pudieran codificar una alantoato amidinohidrolasa (alantoicasa).

4. Regulación del metabolismo del alantoato

4.1. Cambios en el metabolismo del alantoato a lo largo del desarrollo de judía

Numerosos trabajos han mostrado una correlación directa entre la cantidad de ureidos y la fijación de nitrógeno. No obstante, tanto en leguminosas ureídicas no noduladas (fertilizadas con nitrato) como en plantas no leguminosas se han observado niveles significativos de ureidos, contradiciendo la frecuente idea de que sólo en leguminosas ureídicas cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno se encuentran concentraciones altas de ureidos. (Thomas *et al.*, 1980; Thomas y Schrader, 1981a; Schubert y Boland, 1990; Brychkova *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009).

En este trabajo se han estudiado en profundidad los cambios producidos en el metabolismo de los ureidos a lo largo del desarrollo en plantas noduladas y en plantas fertilizadas con nitrato (no noduladas) de judía. Los resultados obtenidos demuestran que en *P. vulgaris* el contenido de ureidos muestra sólo una buena correlación con la fijación de nitrógeno durante la etapa de desarrollo vegetativo. Tras la floración, el contenido de ureidos en las hojas y tallos aumenta más drásticamente que la fijación de nitrógeno (Figura 19 y 20). Además, en hojas y tallos de las plantas fertilizadas con nitrato (sin nódulos) se observaron también niveles significativos de ureidos durante las últimas etapas del desarrollo de la planta. Estos resultados sugieren que el incremento en la concentración de ureidos

durante la fase reproductiva, tanto en las plantas noduladas como en las fertilizadas con nitrato, no proviene únicamente de la fijación de nitrógeno. Los resultados que se muestran en la figura 26 apoyan esta hipótesis e indican que los ureidos en las plantas fertilizadas con nitrato proceden del nitrógeno movilizado desde las hojas más viejas. Esta movilización de N sería también causante del brusco incremento de ureidos observado a 35 DPS en las hojas de las plantas noduladas (Figura 19 y 26). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Herridge y Peoples (1990) en soja, quienes observaron que la correlación entre la fijación de nitrógeno y el contenido de ureidos cambiaba durante la transición entre la fase vegetativa y la reproductiva. También Aveline (1995), utilizando variedades de maduración temprana de soja, sugirió que una fuente de error en la estimación de la fijación de nitrógeno mediante la determinación de ureidos estaba precisamente causada por el nitrógeno que procedía de los tejidos senescentes. Recientemente, en nuestro grupo se ha demostrado que, en condiciones de déficit hídrico, las plantas de judía acumulan ureidos incluso cuando carecen de nódulos (plantas fertilizadas con nitrato), así como en plantas donde los nódulos han dejado ya de funcionar debido a la sequía y se sugiere que los ureidos provienen de la removilización del nitrógeno de los tejidos senescentes (Alamillo *et al.*, 2010). Asimismo, estos resultados están de acuerdo con los trabajos pioneros de Thomas y col. (1979; 1980) usando plantas de judía fertilizadas con diferentes fuentes de nitrógeno, en las que también se encontraban cantidades elevadas de ureidos.

Es interesante mencionar que, tanto en los nódulos como en las raíces de las plantas noduladas, el contenido de ureidos y la expresión de los genes y enzimas relacionados con el metabolismo de estos compuestos siguieron cinéticas similares a la de la fijación de nitrógeno durante todo el desarrollo de la planta (Figuras 19, 20 y 21). En cambio, esta correlación no existía en hojas y tallos de las mismas plantas. De nuevo, esto indica que parte de los ureidos que se encuentran en los tallos y hojas deben sintetizarse a partir del nitrógeno reciclado

de otros órganos, y no de la síntesis de purinas de *novo* a partir del nitrógeno fijado en los nódulos (Figura 19 y 20).

En los tallos y hojas, el ureido más abundante fue el alantoato, excepto en las muestras de 21 DPS donde había tanto alantoína como alantoato. En cambio, en las raíces se observaron niveles similares de alantoína y de alantoato, así como niveles de alantoato generalmente más bajos que en tallos y hojas, de acuerdo con la menor actividad de la enzima alantoinasa observada en las raíces. Del mismo modo, el aumento en los niveles de alantoato en los tallos, tanto en las plantas noduladas como en las fertilizadas con nitrato, se corresponde con un incremento paralelo de la actividad alantoinasa a lo largo del desarrollo en este tejido (Figura 23). Por el contrario, en las hojas no parece haber una correlación entre el contenido de ureidos y la actividad alantoinasa, lo que sugiere que el alantoato acumulado en este tejido proviene en gran parte del transporte a través del tallo.

El incremento de actividad alantoinasa en los tallos está de acuerdo con los resultados obtenidos a principios de los años 80 por Thomas y Schrader (1981a) también en plantas de judía, aunque, dada la poca información molecular disponible en aquellos momentos, en ese trabajo no se analizó la expresión de los genes que codifican esta actividad enzimática. De hecho, a pesar del gran número de trabajos que han estudiado la actividad alantoinasa en plantas, existe poca información acerca de la expresión de los genes que codifican esta actividad enzimática en plantas. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran un patrón muy similar entre la expresión del gen *PvALN.1* y la actividad alantoinasa, tanto en las plantas noduladas como en las fertilizadas con nitrato, especialmente en los tallos (Figura 22). El incremento en la actividad alantoinasa a lo largo del desarrollo de la planta, paralelo al incremento en la expresión del gen *PvALN*, indica que la regulación de la enzima alantoinasa ocurre a nivel transcripcional, al menos en los tallos. Yang y Han (2004) analizaron la expresión del gen de la enzima alantoinasa (ALN) en *Robinia pseudoacacia*, una leguminosa no ureídica. Los resultados obtenidos por estos autores mostraron una mayor expresión de este

gen en el *cambium vascular*, corroborando que en leguminosas no ureídicas el gen de la alantoinasa también se expresa diferencialmente en el tallo. En *Arabidopsis*, Werner y col. (2008) analizaron la expresión del gen *ALN* en plantas cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno. Sus resultados mostraban una reducción de la expresión del gen *ALN* en hojas cuando la planta era fertilizada con nitrato y una mayor expresión en respuesta a la falta de nitrógeno, así como con alantoína como única fuente de nitrógeno. No obstante, no está claro si estos cambios en la expresión del gen de la alantoinasa se deben a una represión por nitrato o a una inducción por déficit de nitrógeno, en el caso de la alantoína como única fuente de nitrógeno. A diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis*, la expresión del gen de la alantoinasa en hojas de judía fue similar en las plantas fertilizadas con nitrato y en las plantas noduladas. No obstante, sí hubo una mayor expresión de este gen en las muestras de tallos procedentes de las plantas noduladas (Figura 22).

Thomas y Schrader (1981a) sugirieron que la causa de la acumulación de ureidos observada en las últimas etapas del desarrollo de plantas de soja no noduladas debía ser la escasa capacidad para degradar el alantoato en esa situación. No obstante, estos autores no determinaron la actividad catalizadora de la degradación del alantoato de estas plantas, ni la expresión de los genes involucrados en ella. Los resultados del trabajo que aquí se presenta muestran que la actividad en hoja de la PH-alcasa (Raso *et al.*, 2007a) fue similar a lo largo del desarrollo, tanto en plantas noduladas como en plantas fertilizadas con nitrato (Figura 25, B). Por su parte, la actividad de la proteína PvAAH (actividad AAH) mostró un descenso a lo largo del desarrollo en hojas, tanto de las plantas noduladas como de las fertilizadas con nitrato. Estos resultados no concuerdan con la expresión del gen *PvAAH* en estos tejidos (Figura 24), pero en cambio sí explicarían el incremento de ureidos observado en este tejido a lo largo del desarrollo de la planta (Figura 19, C). Las diferencias entre los patrones de expresión del gen *PvAAH* y la actividad AAH sugieren que la actividad de la enzima PvAAH está regulada post-transcripcionalmente, que es una conclusión a

la que también llegaron Charlson y col. (2009) y Alamillo y col. (2010) en plantas sometidas a déficit hídrico de soja y de judía, respectivamente. A diferencia de lo que ocurre en judía (Figura 24), la expresión del gen de la AAH fue similar en raíces, tallos y hojas de plantas de *Arabidopsis* (Todd y Polacco, 2006). Asimismo, Werner y col. (2008) observaron que la expresión de este gen era similar en hojas de plantas cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno. Nuestros resultados también muestran que el gen *PvAAH* se expresa de forma similar en condiciones de FBN y nitrato. No obstante, en judía se observó claramente una expresión mayor del gen *PvAAH* en las hojas que en el resto de tejidos (Figura 17 y 24). La discrepancia entre los resultados de ambos trabajos podría explicarse por la mayor sensibilidad de la técnica usada en esta tesis (PCR tiempo real) frente a la de la usada por Todd y Polacco (2006) (RT-PCR semicuantitativa), que podría no ser suficientemente sensible para detectar los cambios moderados en la expresión del gen.

Durante mucho tiempo, el catabolismo del alantoato se ha considerado como el paso limitante del metabolismo de los ureidos (Thomas y Schrader, 1981a), así como una de las causas de la acumulación de ureidos observada en plantas de soja en condiciones de déficit hídrico (King y Purcell, 2005). En cambio, nuestros datos muestran que la acumulación de ureidos en los tallos se produce principalmente por un aumento en la síntesis de alantoato, a través de la inducción de la expresión del gen de la alantoinasa (Alamillo *et al.*, 2010), mientras que en hojas se debería también en parte a una disminución de la actividad AAH, regulada posiblemente a nivel post-transcripcional (Figuras 22, 23, 24 y 25).

Los niveles de ureidos, aminoácidos y nitrato en el xilema de las plantas de judía (Figura 25 y en la tabla 8) se ajustaron a lo esperado para una leguminosa ureídica, que se comporta como ureídica cuando utiliza el N procedente de la FBN pero como amídica cuando crece a expensas de N procedente de la fertilización con nitrato, de acuerdo con los resultados obtenidos por Pate y col. (1980) y otros

muchos autores. Además, la concentración de aminoácidos que se muestran en la tabla 8 concuerda con los resultados obtenidos por Leidi y Rodríguez-Navarro (2000) en plantas de judía fertilizadas con nitrato. No obstante, aunque el xilema de las plantas fertilizadas con nitrato transporta mucha más asparragina y glutamina que el de las plantas noduladas, es interesante señalar que en las plantas noduladas también se produjo un incremento en los niveles de estos dos aminoácidos durante la última etapa del desarrollo, coincidiendo con el llenado de los frutos. Este incremento de asparragina y glutamina, así como de ureidos, observado durante las últimas fases del desarrollo procede probablemente de la removilización de nutrientes de los tejidos senescentes, lo que explicaría las diferencias entre las concentraciones de ureidos determinadas en el xilema, recogido en el primer nudo, y los niveles encontrados en las hojas trifoliadas (Tabla 8). Por otro lado, la baja actividad nitrogenasa encontrada a 21 DPS (Figura 20) podría explicar el elevado nivel de asparragina en el xilema de las plantas noduladas, ya que en ese periodo el nitrógeno fijado aún no es suficiente para suplir las necesidades de la planta (Hungria *et al.*, 1991).

Varios trabajos han mostrado que una gran parte del N que se acumula en los frutos y semillas de plantas de guisante y de otras leguminosas de grano procede de la removilización de compuestos nitrogenados de órganos más viejos (Salon *et al.*, 2001; Schiltz *et al.*, 2005; Munier-Jolain *et al.*, 2008). No obstante, Fischinger y Schulze (2010) mostraron que, durante el desarrollo de frutos de guisante, la tasa de fijación de nitrógeno y de CO₂ aumentaban en los nódulos y propusieron que ello podía ser un mecanismo para suplir la alta demanda de nitrógeno de los frutos en desarrollo de guisante. En cambio, nuestros resultados en plantas de judía no coinciden con las conclusiones de este último trabajo, ya que en judía se observó que la tasa de fijación de nitrógeno descendió justo antes del comienzo del llenado de frutos y, por tanto, el nitrógeno para esta etapa ha de proceder de la movilización de compuestos nitrogenados de los tejidos vegetativos. El aumento en los niveles de ureidos en el xilema tanto de las plantas noduladas

como de las fertilizadas en nitrógeno (Tabla 8) sugiere que los ureidos juegan un papel importante en el desarrollo del fruto en estas plantas. De acuerdo con esto, Ishizuka (1977) propuso que el nitrógeno transportado en forma de ureidos era usado con mayor eficiencia para la producción de proteínas de reserva en las semillas que el nitrógeno procedente de aminoácidos, amidas o nitrato. Además, los altos niveles de ureidos y actividad alantoinasa encontrados en los frutos en desarrollo de judía (Raso *et al.*, 2007b) apuntan a que el metabolismo de los ureidos tiene una función fisiológica importante en el llenado de frutos en estas plantas.

En hojas de plantas noduladas de judía se observó un brusco incremento en el contenido de ureidos entre los 28 y 35 DPS (Figura 19). El análisis en detalle de estos cambios mostró que este incremento de ureidos se producía en tan sólo 1 o 2 días y que coincidía con el inicio de la floración de estas plantas. Además, se observó que la mayoría de las plantas noduladas habían florecido entre los 28 y los 35 DPS, mientras que sólo la mitad de las plantas fertilizadas con nitrato habían florecido a los 35 DPS (Figura 28). A pesar de que estos resultados sugerían una relación entre este incremento de ureidos y la floración temprana de las plantas noduladas, el tratamiento de las plantas noduladas con un inhibidor de síntesis de los ureidos (alopurinol) no produjo un retraso de su floración (Figura 29), lo que indicaba que el incremento brusco de ureidos que acompaña a la floración no puede ser la razón de la floración temprana en las plantas noduladas. Varios autores han observado un adelanto en la floración en diferentes especies de plantas cultivadas con bajas concentraciones de nitrato (Dickens y Staden, 1988; Castro-Marín *et al.*, 2011). Además del aporte de N, también los niveles de carbohidratos pueden afectar al tiempo de floración (Bernier *et al.*, 1993; Eveland y Jackson, 2012). La floración temprana de las plantas noduladas respecto a las fertilizadas con nitrato podría deberse a diferencias en el balance C/N en estas dos situaciones.

En plantas, los niveles de carbohidratos regulan gran número de procesos, como la germinación de la semilla, el llenado de los frutos, la senescencia y la

transición floral (Gibson, 2005; Eveland y Jackson, 2012). No obstante, este tipo de regulación es compleja y aún no está claro si el detonante de algunos de los anteriores procesos son altos o bajos niveles de carbohidratos (Ohto *et al.*, 2001; van Doorn, 2008). Muchos de estos procesos coinciden también con grandes cambios en el metabolismo de los ureidos (Raso *et al.*, 2007a; Quiles *et al.*, 2009; Alamillo *et al.*, 2010). Diferentes autores han observado un incremento en los niveles de glucosa coincidiendo con el momento de la floración y han propuesto que este incremento en los niveles de glucosa podría actuar como una señal para el inicio de la floración (Bodson y Outlaw, 1985; Milyaeva y Komarova, 1988; 1996; Houssa *et al.*, 1991; Lejeune *et al.*, 1991; 1993). Los resultados de Bodson y col. (1977) indican que el incremento en los niveles de glucosa proviene de la degradación del almidón almacenado en los tallos y hojas. El papel de la glucosa como señal de inicio de la floración concuerda con los resultados obtenidos con varios mutantes de *Arabidopsis* afectados en la síntesis y degradación del almidón, así como en plantas de tomate y de patata (Muller-Rober *et al.*, 1992; Micallef *et al.*, 1995; Corbesier *et al.*, 1998). En hojas de plantas de judía cultivadas en FBN se observó un brusco incremento en el contenido de glucosa a 28 DPS (Figura 31). Este aumento en los niveles de glucosa coincidió además con el inicio de la floración (Figura 28) y precedió al incremento drástico en la concentración de ureidos en estas plantas (Figura 19). Además, en plantas de judía de la misma edad fertilizadas con nitrato, pero que aún no habían florecido, se observaron niveles de glucosa y almidón mucho menores a los encontrados en las plantas noduladas (Figuras 30 y 31). Estos resultados concuerdan con los trabajos antes mencionados, y sugieren que los niveles de glucosa, además de actuar como señal para la floración, regulan directa o indirectamente el metabolismo de los ureidos. Esta hipótesis podría servir también para explicar el incremento en los niveles de ureidos observado en las hojas iluminadas de las plantas tratadas en los experimentos de oscuridad parcial (Figura 38), donde se observó también un incremento en los niveles de glucosa (Figura 34). Además, en las hojas de las

plantas sometidas a oscuridad parcial se observó un descenso del contenido de almidón, similar al que se produce en hojas al aumentar su edad (Figura 31), lo que sugiere que el incremento de glucosa se genera a partir de la degradación del almidón almacenado en este tejido, de acuerdo con lo descrito por Bodson y col. (1977). En resumen, el análisis de los niveles de ureidos y carbohidratos en hojas de judía durante el inicio de la etapa reproductiva sugiere que la glucosa actuaría como señal de síntesis de alantoato en las hojas, que servirá probablemente como fuente de nitrógeno para el llenado de los frutos y semillas. Estos resultados contrastan, en cambio, con el efecto de la glucosa en nódulos de judía, en donde altos niveles de glucosa potencian la síntesis de asparragina y reducen la de ureidos (Silvente *et al.*, 2008).

El mayor contenido de carbohidratos en las hojas de las plantas noduladas que en las de las plantas fertilizadas con nitrato (Figura 30) explica la mayor relación entre el peso seco y fresco observada en las plantas noduladas (Tabla 9), posiblemente debido a la acumulación de almidón. Por otra parte, las hojas de las plantas fertilizadas con nitrato fueron ligeramente más grandes, alcanzaron una mayor biomasa y presentaron un mayor contenido en proteína, lo que se explicaría por una deficiencia de N en las plantas noduladas. De acuerdo con estos resultados, varios autores han observado un mayor contenido de carbohidratos en hojas de plantas cultivadas en condiciones de nitrógeno limitante, y sugieren que la causa del mayor contenido en carbohidratos en estas plantas era una disminución en la demanda de esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos y proteínas debido a la deficiencia de nitrógeno (Ono *et al.*, 1996; Ono y Watanabe, 1997; Palenchar *et al.*, 2004). El efecto de la limitación de N sobre la floración fue establecido por Castro-Marín y col. (2011) tras analizar el momento de floración en mutantes de *Arabidopsis* cultivados con diferentes concentraciones de nitrato. Estos autores observaron que las plantas de *Arabidopsis* cultivadas con concentraciones limitantes de nitrato presentaban una menor biomasa y un menor contenido en proteína. Una situación similar es la que se produciría en las plantas

noduladas de judía, cuyas hojas también presentan menor contenido en proteína y clorofilas que las de las plantas fertilizadas con nitrato (Tabla 9), y están de acuerdo con trabajos anteriores que muestran que, por lo general, la fijación de nitrógeno es poco eficiente en judía (Graham y Rosas, 1977; Graham, 1981).

4.2 Regulación del metabolismo del alantoato por luz y oscuridad

Brychkova y col. (2008) observaron un incremento en los niveles de alantoína y alantoato, así como de la expresión de los genes involucrados en la síntesis y degradación de los ureidos en plantas de *Arabidopsis* mantenidas en oscuridad. Con anterioridad a este trabajo, varios autores describieron un incremento en el contenido de ureidos tanto en leguminosas como en plantas no leguminosas mantenidas en oscuridad (Revisado en Thomas *et al.*, 1981b). Por tanto, no es sorprendente que en la región promotora del gen *PvAAH*, así como en la de otros genes de esta ruta, se hayan identificado varios motivos de posible regulación de la transcripción por luz (Figura 7), aunque la relevancia funcional de esas secuencias está aún por demostrar.

En este trabajo no se han encontrado cambios cuantitativamente importantes en los niveles de ureidos en judía a lo largo del ciclo normal de luz y oscuridad (16 h de luz y 8 h de oscuridad) (Figura 32). En *Arabidopsis*, Brychkova y col. (2008) observaron pequeñas oscilaciones del contenido en alantoína en los ciclos de luz/oscuridad, similares a los que hemos observado en judía, aunque los niveles de alantoína en aquellas plantas eran mucho menores. No obstante, en plantas de judía sometidas a oscuridad durante 48 h se observó un incremento en los niveles de ureidos, que se revertía tras 24 h en condiciones de iluminación normales (Figura 33), lo que confirma que estos cambios estaban mediados directamente por la falta de luz. De forma similar, en plantas noduladas de judía mantenidas en condiciones de oscuridad parcial (50% de sus hojas cubiertas) se observó un incremento en los niveles de ureidos en tallos y en las hojas no cubiertas, mientras que en las hojas sometidas a oscuridad los niveles de ureidos

fueron ligeramente más bajos que en los controles (Figura 34). Además, en las plantas con el 50% de las hojas cubiertas se observó un descenso en tasa de fijación de nitrógeno (Figura 37), probablemente debido a la reducción del aporte de carbohidratos a los nódulos, lo que está de acuerdo con los resultados de diversos autores en leguminosas sometidas a condiciones de oscuridad total o parcial (Williams *et al.*, 1982; Siddique y Bal, 1991; Gorgoncena *et al.*, 1997; Schulze, 2003). Estos resultados indican que el incremento de ureidos observado en estas plantas proviene de la movilización de otros compuestos nitrogenados y no de la fijación de nitrógeno, tal y como concluye Schulze (2003) con plantas de guisante y haba en respuesta a una reducción en la capacidad fotosintética. Además, el incremento en la actividad alantoinasa en los tallos de las plantas sometidas a oscuridad parcial (Figura 35) justifica el incremento en ureidos en estas plantas, al igual que ocurre en tallos a lo largo del desarrollo de la planta (Figura 23) o en condiciones de sequía (Alamillo *et al.*, 2010). A diferencia de la actividad alantoinasa, la actividad PH-alcasa no mostró cambios significativos en ninguno de estos tratamientos, mientras que la actividad AAH descendió en las hojas no iluminadas de las plantas tratadas (Figura 24), lo que sugiere que también en estas condiciones la concentración de ureidos depende sobre todo de la regulación (inducción) de la actividad alantoinasa, aunque también de una menor degradación del alantoato, vía AAH.

4.3 Regulación del metabolismo del alantoato por diferentes tipos de estrés

Numerosos trabajos han descrito que los ureidos se acumulan en leguminosas ureídicas sometidas a condiciones de estrés hídrico (Serraj *et al.*, 1999b; King y Purcell, 2005; Charlson *et al.*, 2009). Además, el incremento en los niveles de ureidos, principalmente alantoato, se ha relacionado con la inhibición de la fijación de nitrógeno que se produce en estas condiciones (Serraj *et al.*, 1999b; King y Purcell, 2005). En nuestro grupo, analizamos los niveles de ureidos de plantas de judía sometidas a condiciones de déficit hídrico y observamos un incremento en

los niveles de ureidos en raíces, tallo y hojas pero no en los nódulos (Alamillo *et al.*, 2010). Además, en ese trabajo se observó un incremento en la expresión de los genes de las enzimas uricasa, alantoinasa y alantoato amidohidrolasa en los tejidos sometidos a déficit hídrico, así como un incremento de la actividad alantoinasa en los tallos de estas plantas. El efecto del déficit hídrico sobre la expresión de los genes del metabolismo de los ureidos está de acuerdo con la presencia de los diversos motivos de regulación por estrés identificados en la región promotora de los genes de la alantoato amidohidrolasa (Figura 7) y de la alantoinasa de judía.

Varios autores han propuesto que la causa de la acumulación de ureidos en las plantas sometidas a déficit hídrico sería un descenso en el catabolismo del alantoato, posiblemente debido a una disminución del manganeso disponible en esas condiciones y que es esencial para la actividad de la enzima AAH (Lukaszewski *et al.*, 1992; Vadez *et al.*, 2000; Purcell *et al.*, 2000; Sinclair *et al.*, 2003). No obstante, Werner y col. (2008) concluyeron que es poco probable que la disponibilidad de este micronutriente pueda provocar la inhibición de la actividad AAH en condiciones de déficit hídrico, dada la baja concentración de manganeso necesaria para la actividad AAH (50 μM) y el manganeso existente en hojas de soja (en torno a 40 μM). En nuestro trabajo se han analizado las actividades degradadoras de alantoato AAH y PH-alcasa en hojas de plantas de judía que dejaron de regarse durante 10 días. Se encontró que la actividad PH-alcasa no sufrió cambios significativos, mientras que la actividad AAH disminuyó más de un 50% por el déficit hídrico impuesto (Figura 39). Estos resultados sugieren que la acumulación de ureidos en hojas, principalmente alantoato, está mediada no sólo por el incremento de la actividad alantoinasa sino también por una disminución de la actividad AAH. Dado que la expresión del gen *PvAAH* no sólo no disminuyó en hojas sometidas a déficit hídrico sino que aumentó, estos resultados están de acuerdo con la regulación a nivel post-transcripcional de la actividad AAH que sugerían Charlson y col. (2009) en plantas de soja sometidas a déficit hídrico, así

como a los resultados obtenidos en hojas a lo largo del desarrollo de plantas de judía (Figura 24 y 25).

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína PvAAH podría ser sensible a la oxidación. El aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es una de las primeras respuestas comunes a muchos tipos de estrés, entre ellos el estrés por déficit hídrico (Morán *et al.*, 1994; Mittler, 2002; Mittler *et al.*, 2011). Estas condiciones podrían favorecer la oxidación de los grupos SH de la proteína PvAAH, disminuyendo así su actividad. Por otra parte, diferentes trabajos han mostrado un aumento de las ROS al aumentar la edad de la hoja, así como en plantas sometidas a oscuridad (Guo y Crawford, 2005; Vanacker *et al.*, 2006; Brychkova *et al.*, 2008; Agüera *et al.*, 2010). Por tanto, un cambio en las condiciones redox de la célula, que suponga una disminución de la capacidad reductora y el aumento de la producción de ROS, podría causar la inhibición de la degradación del alantoato, vía AAH, con la consiguiente acumulación de ureidos (alantoato) que acompaña a cada una de las condiciones antes mencionadas. No obstante, esta hipótesis está aún pendiente de comprobación experimental en judía y en otras especies vegetales.

En la región promotora del gen *PvAAH* se han identificado varios motivos de regulación de la transcripción en respuesta a diversas hormonas vegetales, entre ellas el ABA, y por temperatura. De acuerdo con esto, Alamillo y col. (2010) observaron un incremento en la expresión de los genes de la uricasa, alantoinasa y alantoato amidohidrolasa en hojas y tallos tratados con ácido abscísico, lo que sugiere que esta hormona podría estar relacionada con el incremento en la expresión de los genes del metabolismo de los ureidos observado en condiciones de déficit hídrico.

La inducción de los genes relacionados con los ureidos por ABA, y estrés abiótico en general, no afecta sólo a las leguminosas ureídicas, sino que se ha descrito también en *Arabidopsis* (Brychkova *et al.*, 2008; Yesbergenova *et al.*, 2005). Los resultados que se presentan en este trabajo de tesis muestran que los

tratamientos con ácido jasmónico y con ácido salicílico, al igual de choque térmico, provocan también un aumento en la expresión del gen *PvAAH* (Figura 40). No obstante, a pesar del aumento en la expresión del gen *PvAAH* en hojas de plantas tratadas con ABA, SA, JA y choque térmico, no se observaron cambios significativos en los niveles de ureidos en estos tejidos (Figura 41). Esto podría explicarse por la corta duración de los diferentes tratamientos, o por los diferentes niveles de regulación (activación o represión) sobre los diversos genes de la ruta.

Varios trabajos han descrito cambios en diversas enzimas del metabolismo de los ureidos en respuesta a patógenos (Buonaurio y Montalbini, 1994; Montalbini, 1995; Alamillo y García-Olmedo, 2001). Por otra parte, plantas de tabaco tratadas con el inhibidor de XDH, alopurinol, fueron más susceptibles a la infección por virus que las plantas sin tratar (Silvestri *et al.*, 2008). Todos estos resultados apuntan a que el metabolismo de ureidos, además de estar implicado en la tolerancia/sensibilidad a la sequía, podría estar involucrado en las respuestas de defensa frente a patógenos, así como a estrés por temperatura, anoxia, senescencia, etc.

V. CONCLUSIONES

1. Se ha identificado y caracterizado el gen de la alantoato amidohidrolasa en judía, que es la única secuencia en su genoma que codifica una proteína conocida con capacidad para catalizar la degradación del alantoato. Esta enzima cataliza la degradación del alantoato a S-ureidoglicina, CO₂ y amonio.
2. El incremento en la concentración de alantoato observado al bloquear la expresión del gen *PvAAH* en raíces de judía indica que la alantoato amidohidrolasa es la enzima responsable de la degradación del alantoato en judía.
3. La acumulación de alantoato producida en las partes aéreas de las plantas durante las últimas etapas del desarrollo y en tratamientos de oscuridad se debe, en parte, a la removilización de compuestos purínicos de otros tejidos.
4. Los niveles de ureidos en judía se regulan principalmente a través de la inducción transcripcional de la enzima alantoinasa en los tallos, así como por un descenso en hojas de la actividad AAH, regulada a nivel post-transcripcional.
5. El paralelismo entre la acumulación de ureidos y el nivel de glucosa durante la floración de judía y en condiciones de oscuridad sugiere que los niveles de ambos metabolitos están relacionados.
6. Los cambios en el metabolismo de los ureidos en respuesta a sequía y a reguladores como el ácido abscísico, ácido jasmónico y ácido salicílico y la presencia de motivos de regulación por estrés en la región promotora de los genes del metabolismo de ureidos indican que los ureidos están involucrados en la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal R., Burley S.K., Swaminathan S. (2007). Structural analysis of a ternary complex of allantoate amidohydrolase from *Escherichia coli* reveals its mechanics. *Journal of Molecular Biology* 368: 450-463.
- Aguera E., Cabello P., de la Haba P. (2010). Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. *Physiologia Plantarum* 138: 256-267.
- Alamillo J.M., Cardenas J., Pineda M. (1991). Purification and molecular properties of urate oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1076: 203-208.
- Alamillo J.M., García-Olmedo F. (2001). Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* 25: 529-540.
- Alamillo J.M., Díaz-Leal J.L., Sánchez-Morán M.V., Pineda M. (2010). Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell & Environment* 33: 1828-1837.
- Amarger N.L., Macheret V.R., Laguerre G.L. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 996-1006.
- Atkins C.A., Ritchie A., Rowe P.B., McCairns E., Sauer D. (1982). De novo purine synthesis in nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Physiology* 70: 55-60.
- Atkins C.A. (1991). Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. *Biology and biochemistry of nitrogen fixation*: 293-319. Elsevier, Amsterdam.
- Atkins C.A., Smith P.M.C., Storer P.J. (1997). Reexamination of the intracellular localization of de novo purine synthesis in cowpea nodules. *Plant Physiology* 113: 127-135.
- Aveline A. (1995). Early remobilization: a possible source of error in the ureide assay method for N₂ fixation measurement by early maturing soybean (*Glycine max*). *Soil Science and Plant Nutrition* 41: 737-751.

- Bell J.A., Webb M.A. (1995). Immunoaffinity purification and comparison of allantoinases from soybean root-nodules and cotyledons. *Plant Physiology* 107: 435-441.
- Bergmann H., Preddie E., Verma D.P. (1983). Nodulin-35: a subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *The Embo Journal* 2: 2333-2339.
- Bernier G., Havelange A., Houssa C., Petitjean A., Lejeune P. (1993). Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5: 1147-1155.
- Bodson M., King R.W., Evans L.T., Bernier G. (1977). The role of photosynthesis in flowering of the long-day plant *Sinapis alba*. *Functional Plant Biology* 4: 467-478.
- Bodson M., Outlaw W.H. (1985). Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. *Plant Physiology* 79: 420-424.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Broughton W.J., Dilworth M.J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal* 125: 1075-1080.
- Brücher H. (1988). The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. Genetic resources of *Phaseolus* beans: 185-214. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Brychkova G., Alikulov Z., Fluhr R., Sagi M. (2008). A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1 Arabidopsis* mutant. *Plant Journal* 54:496-509.
- Buonaurio R., Montalbini P. (1994). Xanthine-oxidase (Xod) activity in bean-leaves infected by *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *Plant Pathogenic Bacteria*: 633-639. Les Colloques, Versailles.

- Capote-Maínez N., Sánchez F. (1997). Characterization of the common bean uricase II and its expression in organs other than nodules. *Plant Physiology* 115: 1307-1317.
- Castro-Marín I., Loef I., Bartetzko L., Searle I., Coupland G., Stitt M., Osuna D. (2011). Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta* 233: 539-552.
- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., Youngs V.L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant-tissue by nitration of salicylic-acid. *Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80.
- Charlson D.V., Korth K.L., Purcell L.C. (2009). Allantoate amidohydrolase transcript expression is independent of drought tolerance in soybean. *Journal of Experimental Botany* 60: 847-851.
- Corbesier L., Lejeune P., Bernier G. (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206: 131-137.
- Corpas F.J., Palma J.M., Sandalio L.M., Valderrama R., Barroso J.B., Del Rio L.A. (2008). Peroxisomal xanthine oxidoreductase: characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology* 165: 1319-1330.
- Cusa E., Obradors N., Baldoma L., Badia J., Aguilar J. (1999). Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181: 7479-7484.
- Dangeard P.A. (1926). Recherches sur les tubercules radicaux des legumineuses. Les Botaniste, Paris.
- Datta D.B., Triplett E.W., Newcomb E.H. (1991). Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules: implications for the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 4700-4702.
- Debouch D.G., Hidalgo R. (1984). Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.): guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Díaz-Leal J.L., Gálvez-Valdivieso G., Fernández J., Pineda M., Alamillo J.M. (2012). Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* 63: 4095-4106.
- Dickens C.W.S., Staden J.V. (1988). The in vitro flowering of *Kalanchoe blossfeldiana* Poellniz. *Journal of Experimental Botany* 39: 461-471.
- Dixon R.A., Sumner L.W. (2003). Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology* 131: 878-885.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Doyle J.J., Luckow M.A. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131: 900-910.
- Duran V.A., Todd C.D. (2012). Four allantoinase genes are expressed in nitrogen-fixing soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 54: 149-155.
- Estrada-Navarrete G., Alvarado-Affantranger X., Olivares J.E., Díaz-Camino C., Santana O., Murillo E., Guillén G., Sánchez-Guevara N., Acosta J., Quinto C., Li D., Gresshoff P.M., Sánchez F. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1385-1393.
- Estrada-Navarrete G., Alvarado-Affantranger X., Olivares J.E., Guillén G., Díaz-Camino C., Campos F., Quinto C., Gresshoff P.M., Sánchez F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* 2: 1819-1824.

- Eveland A.L., Jackson D.P. (2012). Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experiment Botany* 63: 3367-3377.
- Fischinger S.A., Schulze J. (2010). The importance of nodule CO₂ fixation for the efficiency of symbiotic nitrogen fixation in pea at vegetative growth and during pod formation. *Journal of Experimental Botany* 61: 2281-2291.
- French J.B., Ealick S.E. (2010). Biochemical and structural characterization of a ureidoglycine aminotransferase in the *Klebsiella pneumoniae* uric acid catabolic pathway. *Biochemistry* 49: 5975-5977.
- Freytag G.F., Debouck D.G. (2002). Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (*Leguminosae-Papilionoideae*) in North America, Mexico and Central America. *SIDA Botanical Miscellany* 23: 1-300.
- Gabison L., Prange T., Colloc'h N., El Hajji M., Castro B., Chiadmi M. (2008). Structural analysis of urate oxidase in complex with its natural substrate inhibited by cyanide: mechanistic implications. *BMC Structural Biology* 8: 32.
- Gentry H. (1969). Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Economic Botany* 23: 55-69.
- Gepts P., Aragao F.J.L., Barros E.d., Blair M.W., 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 P.H., 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.
- Gibson S.I. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 93-102.
- Gorgocena Y., Gordon A.J., Escuredo P.R., Minchin F.R., Witty J.F., Morán J.F., Becana M. (1997). N₂ Fixation, carbon metabolism, and oxidative damage in nodules of dark-stressed common bean plants. *Plant Physiology* 113: 1193-1201.

- Graham P.H., Rosas C. (1977). Growth And development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. The Journal of Agricultural Science 88: 503-508.
- Graham P.H. (1981). Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A review. Field Crops Research 4: 93-112.
- Graham P.H., Vance C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiology 131: 872-877.
- Gravenmade E.J., Vogels G.D., van der Drift C. (1970). Hydrolysis, racemization and absolute configuration of ureidoglycolate, a substrate of allantoicase. Biochemica et Biophysica Acta 198: 569-582.
- Guo F.Q., Crawford N.M. (2005). *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. Plant Cell 17: 3436-3450.
- Hanks J.F., Tolbert N.E., Schubert K.R. (1981). Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. Plant Physiology 68: 65-69.
- Henderson J.W., Ricker R.D., Bidlingmeyer A., Woodward C. (2000). Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Agilent Publication.
- Hennebry S.C., Wright H.M., Likic V.A., Richardson S.J. (2006). Structural and functional evolution of transthyretin and transthyretin-like proteins. Proteins 64: 1024-1045.
- Herridge D.F. (1982). Use of the ureide technique to describe the nitrogen economy of field-grown soybeans. Plant Physiology 70: 7-11.
- Herridge D.F., Peoples M.B. (1990) Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. Plant Physiology 93: 495-503.

- Hesberg C., Hänsch R., Mendel R.R., Bittner F. (2004). Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 13547-13554.
- Houssa P., Bernier G., Kinet J.M. (1991). Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in leaf exudate of the short-day plant, *Xanthium strumarium* L. during floral transition. *Journal of Plant Physiology* 138: 24-28.
- Hungria M., Barradas C.A., Wallsgrove R.M. (1991). Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* 42: 839-844.
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Ishizuka J. (1977). Function of symbiotically fixed nitrogen form grain production in soybean. *Proceedings of the International Seminar on Soil Environment and Fertility Management in Intensive Agruculture*: 617-624.
- Jarvis B.D.W., Pankhurst C.E., Patel J.J. (1982). *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32: 378-380.
- Jordan D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from *Leguminous* plants. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32: 136-139.
- Kahn K., Tipton P.A. (1997). Kinetic mechanism and cofactor content of soybean root nodule urate oxidase. *Biochemistry* 36: 4731-4738.
- Kahn K., Tipton P.A. (1998). Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction. *Biochemistry* 37: 11651-11659.
- Kaplan L. (1981). What is the origin of the common bean?. *Economic Botany* 35: 240-254.
- Kim K., Kim M.I., Chung J., Ahn J.H., Rhee S. (2009). Crystal structure of metal-dependent allantoinase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 387: 1067-1074.

- King C.A., Purcell L.C. (2005). Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiology* 137: 1389-1396.
- Koncz C., Schell J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics*. 204: 383-396.
- Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E., Udell S.E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. *Canadian Journal of Microbiology* 38: 501-505.
- Ladrera R.N., Marino D., Larrainzar E.B., González E.M., Arrese-Igor C. (2007). Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. *Plant Physiology* 145: 539-546.
- Lamberto I., Percudani R., Gatti R., Folli C., Petrucco S. (2010). Conserved alternative splicing of *Arabidopsis* transthyretin-like determines protein localization and S-allantoin synthesis in peroxisomes. *Plant Cell* 22: 1564-1574.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lawther R.P., Riemer E., Chojnacki B., Cooper T.G. (1974). Clustering of the genes for allantoin degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 119: 461-468.
- Leidi E.O., Rodríguez-Navarro D.N. (2000). Nitrogen and phosphorus availability limit N₂ fixation in bean. *New Phytologist* 147: 337-346.
- Lejeune P., Bernier G., Kinet J.M. (1991). Sucrose levels in leaf exudate as a function of floral induction in the long day plant *Sinapis alba*. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 153-157.
- Lejeune P., Bernier G., Requier M.C., Kinet J.M. (1993). Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis alba* L. *Planta* 190: 71-74.

- Lichtenthaler H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids - Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Linneo C. (1753). *Species plantarum*. A facsimile (1957-1959) of the first edition (1753). Ray Society, London.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lukaszewski K.M., Blevins D.G., Randall D.D. (1992). Asparagine and boric acid cause allantoate accumulation in soybean leaves by inhibiting manganese-dependent allantoate amidohydrolase. *Plant Physiology* 99: 1670-1676.
- Marino D., Frendo P., Ladrera R., Zabalza A., Puppo A., Arrese-Igor C., González E.M. (2007). Nitrogen fixation control under drought stress. Localized or systemic? *Plant Physiology* 143: 1968-1974.
- Martínez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P., Pardo M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 417-426.
- Masclaux C., Valadier M.H., Brugiére N., Morot-Gaudry J.-F., Hirel B. (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211: 510-518.
- Masclaux-Daubresse C. F., Daniel-Vedele J., Dechorgnat F., Chardon L., Gaufichon F., Suzuki A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105: 1141-1157.
- Masuda W., Fujiwara S., Noguchi T. (2001). A new type of allantoinase in amphibian liver. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65: 2558-2560.

- McClure P.R., Israel D.W. (1979). Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiology* 64: 411-416.
- McClure P.R., Israel D.W., Volk R.J. (1980). Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans: greenhouse studies. *Plant Physiology* 66: 720-725.
- Micallef B.J., Haskins K.A., Vanderveer P.J., Roh K.S., Shewmaker C.K., Sharkey T.D. (1995). Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have an increased capacity for sucrose synthesis. *Planta* 196: 327-334.
- Milyaeva E.L., Komarova E.N. (1988). Sugar content in the stem apices of *Rudbeckia bicolor* at floral evocation. *Russian Journal of Plant Physiology* 35: 187-189.
- Milyaeva E.L., Komarova E.N. (1996). Changes in the sugar content in stem apices of the short-day plant *Perilla nankinensis* at floral transition. *Russian Journal of Plant Physiology* 43: 149-154.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler R., Vanderauwera S. Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16: 300-309.
- Montalbini P. (1995). Effect of rust infection on purine catabolism enzyme levels in wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 275-292.
- Montalbini P. (1998). Purification and some properties of xanthine dehydrogenase from wheat leaves. *Plant Science* 134: 89-102.
- Morán J.F., Becana M., Iturbe-Ormaetxe I., Frechilla S., Klucas R.V., Aparicio-Tejo P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352.
- Muller-Rober B., Sonnewald U., Willmitzer L. (1992). Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing

- tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *Embo Journal* 11: 1229-1238.
- Munier-Jolain N., Larmure A., Salon C. (2008). Determinism of carbon and nitrogen reserve accumulation in legume seeds. *Comptes Rendus Biologies* 331: 780-787.
- Muñoz A., Piedras P., Aguilar M., Pineda M. (2001). Urea is a product of ureidoglycolate degradation in chickpea. Purification and characterization of the ureidoglycolate urea-lyase. *Plant Physiology* 125: 828-834.
- Muñoz A., Raso M.J., Pineda M., Piedras P. (2006). Degradation of ureidoglycolate in French bean (*Phaseolus vulgaris*) is catalysed by a ubiquitous ureidoglycolate urea-lyase. *Planta* 224: 175-184.
- Muñoz A., Bannenberg G.L., Montero O., Cabello-Díaz J.M., Piedras P., Pineda M. (2011). An alternative pathway for ureide usage in legumes: enzymatic formation of a ureidoglycolate adduct in *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Experimental Botany* 62: 307-318.
- Nakagawa A., Sakamoto S., Takahashi M., Morikawa H., Sakamoto A. (2007). The RNAi-mediated silencing of xanthine dehydrogenase impairs growth and fertility and accelerates leaf senescence in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant & Cell Physiology* 48: 1484-1495.
- Nelson D.L., Cox M.M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman, New York .
- Nour S.M., Fernández M.P., Normand P., Cleyet-Marel J.C. (1994). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 511-522.
- O'hara G., Boonkerd N., Dilworth M. (1988). Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil* 108: 93-110.
- Ohto M., Onai K., Furukawa Y., Aoki E., Araki T., Nakamura K. (2001). Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 252-261.

- Ono K., Terashima I., Watanabe A. (1996). Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old Leaves. *Plant & Cell Physiology* 37: 1083-1089.
- Ono K., Watanabe A. (1997). Levels of endogenous sugars, transcripts of *rbcS* and *rbcL*, and of *ruBisco* protein in senescing sunflower leaves. *Plant & Cell Physiology* 38: 1032-1038.
- Palenchar P.M., Kouranov A., Lejay L.V., Coruzzi G.M. (2004). Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. *Genome Biology* 5: R91.
- Pate J.S., Atkins C.A., White S.T., Rainbird R.M., Woo K.C. (1980). Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiology* 65: 961-965.
- Patterson T.G., LaRue T.A. (1983). N₂ fixation (C₂H₂) and ureide content of soybeans: environmental effects and source-sink manipulations. *Crop Science*. 23: 819-824.
- Peoples M.B., Atkins C.A., Pate J.S., Murray D.R. (1985a). Nitrogen nutrition and metabolic interconversions of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. *Plant Physiology* 77: 382-388.
- Peoples M.B., Pate J.S., Atkins C.A. (1985b). The effect of nitrogen-source on transport and metabolism of nitrogen in fruiting plants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Journal of Experimental Botany* 36: 567-582.
- Peoples M.B., Dalling J.D. (1988). The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. *Senescence and Aging in Plants*: 181-217. Academic Press, New York.
- Pérez-Vicente R., Pineda M., Cárdenas J. (1987). Occurrence of an NADH diaphorase activity associated with xanthine dehydrogenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS Microbiology Letters* 43: 321-325.

- Pessoa J., Sarkany Z., Ferreira-da-Silva F., Martins S., Almeida M., Li J., Damas A. (2010). Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* transthyretin-like protein. *BMC Plant Biology* 10: 30.
- Piedras P., Muñoz A., Aguilar M., Pineda M. (2000). Allantoate amidinohydrolase (Allantoicase) from *Chlamydomonas reinhardtii*: its purification and catalytic and molecular characterization. *Archives of Biochemistry Biophysics* 378: 340-348.
- Pineda M., Fernández E., Cárdenas J. (1984). Urate oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum* 62: 453-457.
- Purcell L.C., King C.A., Ball R.A. (2000). Soybean cultivar differences in ureides and the relationship to drought tolerant nitrogen fixation and manganese nutrition. *Crop Science*. 40: 1062-1070.
- Purcell L.C., Serraj R., Sinclair T.R., De A. (2004). Soybean N fixation estimates, ureide concentration, and yield responses to drought. *Crop Science*. 44: 484-492.
- Quiles F.A., Raso M.J., Pineda M., Piedras P. (2009) Ureide metabolism during seedling development in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 135: 19-28.
- Rainbird R.M., Atkins C.A. (1981). Purification and some properties of urate oxidase from nitrogen-fixing nodules of cowpea. *Biochimica et Biophysica Acta* 659:132-40.
- Ramazzina I., Folli C., Secchi A., Berni R., Percudani R. (2006). Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nature Chemical Biology* 2: 144-148.
- Ramazzina I., Cendron L., Folli C., Berni R., Monteverdi D., Zanotti G., Percudani R. (2008). Logical identification of an allantoinase analog (puuE) recruited from polysaccharide deacetylases. *Journal of Biological Chemistry* 283: 23295-23304.

- Ramazzina I., Costa R., Cendron L., Berni R., Peracchi A., Zanotti G., Percudani R. (2010). An aminotransferase branch point connects purine catabolism to amino acid recycling. *Nature Chemical Biology* 6: 801-806.
- Raso M.J., Muñoz A., Pineda M., Piedras P. (2007a). Biochemical characterisation of an allantoinase-degrading enzyme from French bean (*Phaseolus vulgaris*): the requirement of phenylhydrazine. *Planta* 226: 1333-1342.
- Raso M.J., Pineda M., Piedras P. (2007b). Tissue abundance and characterization of two purified proteins with allantoinase activity from French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* 131: 355-366.
- Polhill R.M., Raven P.H., Stirton C.H. (1981). *Advances in legume systematics*. Missouri Botanic Gardens, Missouri.
- Raychaudhuri A., Tipton P.A. (2002). Cloning and expression of the gene for soybean hydroxyisourate hydrolase. Localization and implications for function and mechanism. *Plant Physiology* 130: 2061-2068.
- Reynolds P.H., Boland M.J., Blevins D.G., Randall D.D., Schubert K.R. (1982). Ureide biogenesis in leguminous plants. *Trends in Biochemical Sciences* 7: 366-368.
- Romanov V., Merski M.T., Hausinger R.P. (1999). Assays for allantoinase. *Analytical Biochemistry* 268: 49-53.
- Salon C., Munier-Jolain N.G., Duc G., Voisin A.S., Grandgirard D., Larmure A., Emery R.J.N., Ney B. (2001). Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: A review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie* 21: 539-552.
- Sánchez F., Campos F., Padilla J., Bonneville J.M., Enríquez C., Caput D. (1987). Purification, cDNA cloning, and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 84: 1143-1147.
- Sandalio L.M., Fernández V.M., Rupérez F.L., Del Río L.A. (1988). Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiology* 87: 1-4.

- Santos L.C., Ferreira L.A., Carmezini J.A., Antunes R.A. (2009). Variation in the ureide content of jack bean during the reproductive stages in response to nitrate. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 581-585.
- Sarma A.D., Serfozo P., Kahn K., Tipton P.A. (1999). Identification and purification of hydroxyisourate hydrolase, a novel ureide-metabolizing enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 274: 33863-33865.
- Sawada H., Kuykendall L.D., Young J.M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology* 49: 155-179.
- Schiltz S., Munier-Jolain N., Jeudy C., Burstin J., Salon C. (2005). Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by ^{15}N in vivo labeling throughout seed filling. *Plant Physiology* 137: 1463-1473.
- Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D.L., Song Q., Thelen J.J., Cheng J., Xu D., Hellsten U., May G.D., Yu Y., Sakurai T., Umezawa T., Bhattacharyya M.K., Sandhu D., Valliyodan B., Lindquist E., Peto M., Grant D., Shu S., Goodstein D., Barry K., Futrell-Griggs M., Abernathy B., Du J., Tian Z., Zhu L., Gill N., Joshi T., Libault M., Sethuraman A., Zhang X.-C., Shinozaki K., Nguyen H.T., Wing R.A., Cregan P., Specht J., Grimwood J., Rokhsar D., Stacey G., Shoemaker R.C., Jackson S.A. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.
- Schubert K.R. (1981). Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max*: I. Comparison of activities with N_2 fixation and composition of xylem exudate during nodule development. *Plant Physiology* 68: 1115-1122.
- Schubert K.R. (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants. Synthesis, transport, and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 37: 539-574.
- Schubert K.R., Boland M.J. (1990). The ureides. *The biochemistry of plants*: 197-283. Academic Press, San Diego.

- Schultz A.C., Nygaard P., Saxild H.H. (2001). Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the PucR transcription activator. *Journal of Bacteriology* 183: 3293-3302.
- Schulze J. (2003). Source-sink manipulations suggest an N-feedback mechanism for the drop in N₂ fixation during pod-filling in pea and broad bean. *Journal of Plant Physiology* 160: 531-537.
- Segovia L., Young J., W. P., Martínez-Romero E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 374-377.
- Serraj R., Sinclair T.R., Purcell L.C. (1999a). Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany* 50: 143-155.
- Serraj R., Vadez V.V., Denison R.F., Sinclair T.R. (1999b). Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiology* 119: 289-296.
- Serventi F., Ramazzina I., Lamberto I., Puggioni V., Gatti R., Percudani R. (2010). Chemical basis of nitrogen recovery through the ureide pathway: formation and hydrolysis of S-ureidoglycine in plants and bacteria. *ACS Chemical Biology* 5: 203-214.
- Shelp B.J., Ireland R.J. (1985). Ureide metabolism in leaves of nitrogen-fixing soybean plants. *Plant Physiology* 77: 779-783.
- Shin I., Percudani R., Rhee S. (2012). Structural and functional insights into (S)-ureidoglycine aminohydrolase, a key enzyme of purine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 287: 18796-18805.
- Shoemaker R.C., Polzin K., Labate J., Specht J., Brummer E.C., Olson T., Young N., Concibido V., Wilcox J., Tamulonis J.P., Kochert G., Boerma H.R. (1996). Genome duplication in soybean (*Glycine* subgenus soja). *Genetics* 144: 329-338.

- Siddique A.-b.M., Bal A.K. (1991). Nitrogen fixation in peanut nodules during dark periods and detopped conditions with special reference to lipid bodies. *Plant Physiology* 95: 896-899.
- Silvente S., Reddy P.M., Khandual S., Blanco L., Alvarado-Affantranger X., Sánchez F., Lara-Flores M. (2008). Evidence for sugar signalling in the regulation of asparagine synthetase gene expressed in *Phaseolus vulgaris* roots and nodules. *Journal of Experimental Botany* 59: 1279-1294.
- Silvestri S., Murphy A.M., Buonauro R., Carr J.P. (2008). Allopurinol, an inhibitor of purine catabolism, enhances susceptibility of tobacco to tobacco mosaic virus. *Virus Research* 137: 257-260.
- Sinclair T.R., Muchow R.C., Bennett J.M., Hammond L.C. (1987). Relative sensitivity of nitrogen and biomass accumulation to drought in field-grown soybean. *Agronomy Journal*. 79: 986-991.
- Sinclair T.R., Serraj R. (1995). Legume nitrogen fixation and drought. *Nature* 378: 344-344.
- Sinclair T.R., Vadez V., Chenu K. (2003). Ureide accumulation in response to Mn nutrition by eight soybean genotypes with N fixation tolerance to soil drying. *Crop Science*. 43: 592-597.
- Singh S., Gepts P., Debouck D. (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, *Fabaceae*). *Economic Botany* 45: 379-396.
- Singh S.P. (1992). Common Bean Improvement in the Tropics. *Plant Breeding Reviews* 110: 199-269.
- Smil V. (1999). Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles* 13: 647-662.
- Smith P.M., Atkins C.A. (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128: 793-802.
- Somers D.A., Samac D.A., Olhoft P.M. (2003). Recent advances in legume transformation. *Plant Physiology* 131: 892-899.

- Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517.
- Sprent J.I., Embrapa. (1980). Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some *Leguminosae*. *Plant, Cell & Environment* 3: 35-43.
- Stebbins N.E., Polacco J.C. (1995). Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiology* 109: 169-175.
- Stitt M., Lilley R.M., Gerhardt R., Heldt H.W., Sidney Fleischer B.F. (1989). Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* 32: 518-552.
- Strasburger E. (1994). *Tratado de Botánica 8ª Edición*. Omega, España.
- Subhash Reddy R., Venkateswara Rao N., Sivarama Sastry K. (1989). Acetohydroxamate, a competitive inhibitor of allantoinases of *Vigna radiata*. *Phytochemistry* 28: 47-49.
- Thomas R.J., Feller U., Erismann K.H. (1979). The effect of different inorganic nitrogen sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* 82: 657-669.
- Thomas R.J., Feller U., Erismann K.H. (1980). Ureide metabolism in non-nodulated *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* 31: 409-417.
- Thomas R.J., Schrader L.E. (1981a). The Assimilation of ureides in shoot tissues of soybeans: 1. Changes in allantoinase activity and ureide contents of leaves and fruits. *Plant Physiology* 67: 973-6.
- Thomas R.J., and Schrader L.E. (1981b). Ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry* 20: 361-371.
- Todd C.D., Polacco J.C. (2004). Soybean cultivars 'Williams 82' and 'Maple Arrow' produce both urea and ammonia during ureide degradation. *Journal of Experimental Botany* 55: 867-877.

- Todd C.D., Polacco J.C. (2006). AtAAH encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 223: 1108-1113.
- Todd C.D., Tipton P.A., Blevins D.G., Piedras P., Pineda M., Polacco J.C. (2006). Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany* 57: 5-12.
- Toledo I., Lloret L., Martínez-Romero E. (2003). *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* 26: 54-64.
- Triplett E.W., Blevins D.G., Randall D.D. (1982). Purification and properties of soybean nodule xanthine dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 219: 39-46.
- Vadez V., Sinclair T.R. (2000). Ureide degradation pathways in intact soybean leaves. *Journal of Experimental Botany* 51: 1459-1465.
- Vadez V., Sinclair T.R., Serraj R., Purcell L.C. (2000). Manganese application alleviates the water deficit-induced decline of N₂ fixation. *Plant, Cell & Environment* 23: 497-505.
- Vadez V., Sinclair T.R. (2001). Leaf ureide degradation and N₂ fixation tolerance to water deficit in soybean. *Journal of Experimental Botany* 52: 153-159.
- Van Doorn W.G. (2008). Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels?. *Journal of Experimental Botany* 59: 1963-1972.
- Van der Drift C., De Windt F.E., Vogels G.D. (1970). Allantoate hydrolysis by allantoate amidohydrolase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 136: 273-279.
- Vanacker H., Sandalio L.M., Jiménez A., Palma J.M., Corpas F.J., Meseguer V., Gómez M., Sevilla F., Leterrier M., Foyer C.H., del Río L.A. (2006). Roles for redox regulation in leaf senescence of pea plants grown on different sources of nitrogen nutrition. *Journal of Experimental Botany* 57: 1735-1745.

- Vigetti D., Monetti C., Pollegioni L., Taramelli R., Bernardini G. (2000). *Xenopus* allantoicase: molecular cloning, enzymatic activity and developmental expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 379: 90-96.
- Vigetti D., Monetti C., Bernardini G. (2001). Molecular cloning of mouse allantoicase cDNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1519: 117-121.
- Vogels G.D. (1966). Reversible activation of allantoate amidohydrolase by acid-pretreatment and other properties of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 113: 277-291.
- Vogels G.D., Trijbels F., Uffink A. (1966). Allantoinases from bacterial, plant and animal sources I. Purification and enzymic properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology and Biological Oxidation* 122: 482-496.
- Vogels G.D., van der Drift C. (1966). Allantoinases from bacterial, plant and animal sources II. Effect of bivalent cations and reducing substances on the enzymic activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Enzymology and Biological Oxidation* 122: 497-509.
- Vogels G.D., van der Drift C. (1970). Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry* 33: 143-157.
- Vogels G.D., van der Drift C. (1976). Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriological Reviews* 40: 403-468.
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* 33: 949-956.
- Watanabe S., Nakagawa A., Izumi S., Shimada H., Sakamoto A. (2010). RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 584: 1181-1186.
- Webb M.A., Lindell J.S. (1993). Purification of allantoinase from soybean seeds and production and characterization of anti-allantoinase antibodies. *Plant Physiology* 103: 1235-1241.

- Werner A.K., Sparkes I.A., Romeis T., Witte C.P. (2008). Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiology* 146: 418-430.
- Werner A.K., Romeis T., Witte C.P. (2010). Ureide catabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology* 6: 19-21.
- Werner A.K., Witte C.P. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends in Plant Science* 16: 381-387.
- Whelan A., Alexander M. (1986). Effects of low pH and high Al, Mn and Fe levels on the survival of *Rhizobium trifolii* and the nodulation of subterranean clover. *Plant and Soil* 92: 363-371.
- Williams L.E., Dejong T.M., Phillips D.A. (1982). Effect of changes in shoot carbon-exchange rate on soybean root nodule activity. *Plant Physiology* 69: 432-436.
- Winkler R.G., Polacco J.C., Blevins D.G., Randall D.D. (1985). Enzymic degradation of allantoate in developing soybeans. *Plant Physiology* 79: 787-793.
- Winkler R.G., Blevins D.G., Polacco J.C., Randall D.D. (1987). Ureide catabolism of soybean: II. Pathway of catabolism in intact leaf tissue. *Plant Physiology* 83: 585-591.
- Winkler R.G., Blevins D.G., Randall D.D. (1988). Ureide catabolism in soybeans: III. Ureidoglycolate amidohydrolase and allantoate amidohydrolase are activities of an allantoate degrading enzyme complex. *Plant Physiology* 86: 1084-1088.
- Witte C.P., Medina-Escobar N. (2001). In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical Biochemistry* 290: 102-107.
- Witte C.P., Noel L.D., Gielbert J., Parker J.E., Romeis T. (2004). Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Molecular Biology* 55: 135-147.

- Witte C.P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science* 180: 431-438.
- Witty J.F., Minchin F.R. (1998). Methods for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root systems. *Journal of Experimental Botany* 49: 1041-1047.
- Xu L.M., Ge C., Cui Z., Li J., Fan H. (1995a). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 706-711.
- Xu Z., de Windt F.E., van der Drift C. (1995b). Purification and characterization of allantoate amidohydrolase from *Bacillus fastidiosus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 324: 99-104.
- Yang J., Han K.H. (2004). Functional characterization of allantoinase genes from *Arabidopsis* and a nonureide-type legume black locust. *Plant Physiology* 134: 1039-1049.
- Yesbergenova Z., Yang G., Oron E., Soffer D., Fluhr R., Sagi M. (2005). The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *Plant Journal* 42 : 862-876.
- Yoo H.S., Cooper T.G. (1991). Sequences of two adjacent genes, one (DAL2) encoding allantoinase and another (DCG1) sensitive to nitrogen-catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 104: 55-62.
- Zahran, H.H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 968-89.
- Zarepour M., Kaspari K., Stagge S., Rethmeier R., Mendel R.R., Bittner F. (2010). Xanthine dehydrogenase AtXDH1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its NADH oxidase activity. *Plant Molecular Biology* 72: 301-310.
- Zehr B.D., Savin T.J., Hall R.E. (1989). A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 182: 157-159.

Zrenner R., Stitt M., Sonnewald U., Boldt R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 805-836.

