



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Caracterización Funcional de Mutantes de
Peroxidasas Implicadas en la Biosíntesis de
Ligninas en *Arabidopsis thaliana*

D. Francisco Fernández Pérez
2015

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Facultad de Biología
Departamento de Fisiología Vegetal

Caracterización funcional de mutantes de
peroxidasas implicadas en la biosíntesis de
ligninas en *Arabidopsis thaliana*

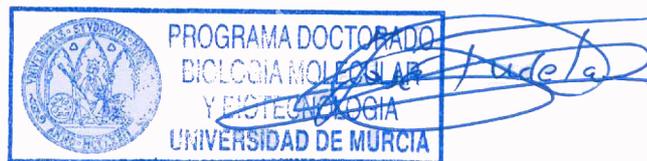
Memoria presentada por el
Lcdo. Francisco Fernández Pérez
para aspirar al grado de Doctor



D. Jose Bautista Tudela Serrano, Profesor Titular de Universidad del Área de Bioquímica y Biología molecular A y **Presidente Comisión Académica programa doctorado *** Biología Molecular y Biotecnología, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Caracterización funcional de mutantes de peroxidasas implicadas en la biosíntesis de ligninas en Arabidopsis thaliana", realizada por D. Francisco Fernández Pérez, bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a. María Ángeles Pedreño García y Esther Novo Uzal, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 30/01/2015, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 30 de Enero de de 2015



Doctorando: D. Francisco Fernández Pérez



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. María Ángeles Pedreño García, Catedrática de Universidad del Área de Fisiología Vegetal en el Departamento de Biología Vegetal, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización funcional de mutantes de peroxidasas implicadas en la biosíntesis de ligninas en *Arabidopsis thaliana*", realizada por D. Francisco Fernández Pérez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Febrero de 2015



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Esther Novo Uzal, Doctora de Universidad del Área de Fisiología Vegetal en el Departamento de Biología Vegetal, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización funcional de mutantes de peroxidasas implicadas en la biosíntesis de ligninas en *Arabidopsis thaliana*", realizada por D. Francisco Fernández Pérez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 2 de Febrero de 2015

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Dpto. de Biología Vegetal (U.D. Fisiología Vegetal) de la Ftad. de Biología de la Universidad de Murcia en colaboración con el Dpto. de Biología Vegetal, Animal y Ecología de la Ftad. de Ciencias de la Universidad de La Coruña, con la ayuda de una beca del **Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU)** del Ministerio de Educación y Ciencia (Ref. 2506), y ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2009-08151).

Los resultados de la presente Memoria han sido incluidos en los siguientes trabajos de investigación:

Publicaciones científicas

***estos autores han contribuido a este trabajo de manera equitativa**

Herrero J, Fernández-Pérez F, Yebra T*, Novo-Uzal E, Pomar F, Pedreño MA, Cuello J, Guéra A, Esteban-Carrasco A, Zapata JM. 2013. Bioinformatic and functional characterization of the basic peroxidase 72 from *Arabidopsis thaliana* involved in lignin biosynthesis. *Planta*. 237: 1599-1612.

Novo-Uzal E, Fernández-Pérez F, Herrero J, Gutiérrez J, Gómez-Ros LV, Bernal MA, Díaz J, Cuello J, Pomar F, Pedreño MA. 2013. From *Zinnia* to *Arabidopsis*: approaching the involvement of peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*. 64: 3499-3518.

Fernández-Pérez F, Pomar F, Pedreño MA, Novo-Uzal E. 2014. The suppression of *AtPrx52* affects fibres but not xylem lignification in *Arabidopsis* by altering syringyl units proportion. *Physiologia Plantarum*. doi:10.1111/ppl.12310.

Fernández-Pérez F, Vivar T, Pomar F, Pedreño MA, Novo-Uzal E. 2015. Peroxidase 4 is involved in syringyl lignin formation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*. 175: 86-94

Comunicaciones a congresos

Herrero J, Yebra T, Fernández-Pérez F, Esteban-Carrasco A, Cuello J, Zapata JM, Guéra A, Pedreño MA. Photosynthetic differences in *Arabidopsis knock out* mutants of two peroxidases probably involved in lignification. Póster. Plant Biology (FESPB). Freiburg (Alemania) 2012

Herrero J, Fernández-Pérez F, Cuello J, Pedreño MA, Pomar F, Zapata JM, Esteban A. Charge surface properties could determine the protein/cell wall interactions of *Arabidopsis thaliana* Peroxidases (Atprxs) involved in lignin biosynthesis. Póster. 23rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR). Viena (Austria) 2012

Herrero J, Yebra T, Fernández-Pérez F, Pedreño MA, Cuello J, Esteba A, Guéra A, Zapata JM. Bioinformatic and physiological characterization of an *Arabidopsis* AtPrx72 knock out mutant for a peroxidase involved in lignification. Comunicación oral. XIII Congreso Luso-Español de Fisiología Vegetal. Lisboa (Portugal) 2013

Fernández-Pérez F, Vivar T, Pedreño MA, Novo-Uzal E. Involvement of *Arabidopsis* AtPrx4 in stem lignification. Póster. XIII Congreso Luso-Español de fisiología vegetal. Lisboa (Portugal) 2013

Fernández-Pérez F, Herrero J, Cuello J, Pomar F, Zapata JM, Pedreño MA, Novo-Uzal E. The suppression of *atprx52* affects fibers but not xylem lignification in *Arabidopsis*, by altering syringyl units proportion. Póster. XIII Congreso Luso-Español de fisiología vegetal. Lisboa (Portugal) 2013

Fernández-Pérez F, Pomar F, Pedreño MA, Novo-Uzal E. Transcriptional network of phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis* peroxidase 52 mutants. Póster. Plant Biology Europe FESPB/EPSO. Dublín (Irlanda) 2014

Fernández-Pérez F, Borja M, Herrero J, Pomar F, Pedreño MA, Novo-Uzal E. Characterizing syringyl peroxidases using *Arabidopsis* mutants. Comunicación oral. Oxizymes. Viena (Austria) 2014

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han contribuido a que se lleve a cabo esta tesis doctoral, desde los que han participado directamente hasta aquellos que me han dado su apoyo y compañía.

En primer lugar me gustaría agradecer su apoyo y dedicación a mis directores de Tesis, los cuales no han sido solo mis maestros, sino que también se han convertido en amigos y compañeros.

Al catedrático Alfonso Ros Barceló a pesar de haber trabajado muy poco tiempo con él por circunstancias del destino siempre me trató muy bien y me ofreció la posibilidad de comenzar esta temática de Tesis. Siempre recordaré la frase si “se tienen que estrellar, que sean los demás”.

A la catedrática María Ángeles Pedreño García que aunque saturada de correo, me acogió en su laboratorio y puso su confianza en mi aun siendo un inexperto recién licenciado.

A la doctora Esther Novo Uzal no sé cómo expresar todo lo que ha hecho por mí, no sólo ha sido directora sino también compañera en mis experimentos y además amiga y confidente. Parte de esta tesis se la debo a ella, además de numerosos momentos “hilarantes” que hemos pasado en el laboratorio por todo ello muchas gracias de corazón Esther. Por cierto recuerda que ahora Estambul no es Constantinopla ni tampoco Budapest.

A Federico Pomar que me trató como uno más en su laboratorio de Coruña y mantuve alguna conversación con él que me hizo quitarme gran peso de encima. Por cierto que aunque sea del Real Madrid bebe agua de la fuente de Canaletas.

A Laura Vanessa quien trabajó codo con codo, literalmente, conmigo en el primer año del laboratorio y tuvo que soportar mis indecisiones con respecto a mi Tesis día si y día también aunque ella nunca se quejó, creo. Muchas gracias.

A Sarai por su gran apoyo profesional pero sobre todo personal en los duros comienzos, por las risas de los cafés con su “mono con platillos” conectado constantemente. Eres una gran persona y ahora también una gran mamá, vales mucho.

A Ana Belén por ser muy grande a pesar de ser bajita, siempre he dicho que eres muy buena trabajando en el laboratorio y además siempre con una sonrisa aunque sea cuando me pilló el dedo con el cajón. Gracias por compartir esos pequeños momentos conmigo.

A Lorena, qué decir, no sabes nunca qué puedes escuchar cuando va a comenzar a hablar, es imprevisible, si no quieres una comida aburrida y en silencio solo llama a "Lore". Muchas gracias por todo y recuerda que lo importante son los estudios "preliminares".

A Begoña por hacer siempre la estancia tanto en el laboratorio como fuera muchísimo más amena y recuerda que, 333.33333333 ml de cualquier sustancia líquida es una gran cantidad.

A Rosa por acompañarme en las largas jornadas laborales y hacerlas más llevaderas con su risas y juegos de palabras. Sigo esperando una invitación de boda.

A Pepe Parra o HPLC man o MacGyver, no hay nada que no se pueda arreglar si estás a su lado y tiene una caja de herramientas, me has enseñado todo lo que sé del HPLC y fuiste gran apoyo en el comienzo de mi andanza por el laboratorio. Ese dedo arriba que llega un Donut.

A Pepita por su disposición para solucionar cualquier problemilla y aguantarnos a todos todos los días, en especial a mi que siempre "Hay una cosa que le quiero decir". Muchas gracias por todo y toros.

Al resto de compañeros del laboratorio (Tamara, Pascual, María, PJ, David y Liber) gracias por compartir los buenos y malos momentos sois grandes personas, aunque me meta mucho con algunos pero eso significa que me importáis chic@s.

A los chicos del laboratorio de Coruña (Jorge, Javi y Tere) por hacer más amena mi estancia fuera de casa y por enseñarme que gente buena la encuentras en muchos sitios.

A todos mis amigos quienes han sabido entenderme a pesar de que siempre me preguntaran que me quedaba para terminar. Al grupito de las enfermeras siempre tan ansiosas por saber que hacía en el laboratorio e intentar encontrar sesgos de investigación en mis publicaciones. En especial a Sergio más que amigo casi hermano por apoyarme en lo profesional y lo personal de esas personas que nunca jamás te fallan y pasa el tiempo que pase siempre está ahí.

A Loli, Pedro y María por su apoyo incondicional y con los cuales comencé la andanza de esta Tesis.

A todos los miembros del SACE, a los del servicio de microscopía que me enseñaron el manejo de los distintos microscopios a Paco, Manoli, José Joaquín y, en

especial, a Maruja que me dio grandes consejos; a los del servicio de cultivos a Juana, a Toñi y como no a Pepe por su afán de ser director de cine.

A la Unidad de Cromatografía de Servicios de Apoyo a la Investigación de la universidad de Coruña, por los análisis de tioacidolisis.

A mi familia tanto los que están como a los que se han ido durante estos años de tesis siempre apoyándome y dándome ánimos cuando me veían cabizbajo o desanimado. Gracias de corazón.

A Eli porque en este poco tiempo que la conozco me ha apoyado muchísimo y me ha animado siempre a continuar aunque fuera solo por la mañana por qué por la tarde había que ir al templete.

Sobre todo agradezco a mi madre (Manoli) y a mis dos hermanos (Jesús y Juan Manuel), ellos sí son los responsables de la realización de esta tesis. Sin su apoyo y comprensión no hubiera sido posible terminar con este trabajo muchas gracias y os quiero. A mi padre (Juan Francisco) que a pesar de no estar con nosotros seguro que estaría muy orgulloso de ver este trabajo.

A mis Padres

Índice

INTRODUCCIÓN

I. La pared celular vegetal	1
II. Lignificación	4
II.1. Naturaleza, composición y localización de las ligninas	6
II.2. Biosíntesis de ligninas	10
II.3. Transporte de monolignoles	13
II.4. La etapa de polimerización	14
II.5. Lignificación en la célula vegetal	17
II.6. Restricciones en el proceso de lignificación	19
III. Peroxidasas	20
III.1. Naturaleza y estructura	24
III.2. Funciones de las peroxidasas de clase III	25
III.3. Papel fisiológico de la lignificación	27
III.4. La peroxidasas básica de <i>Zinnia elegans</i>	28
III.5. Especificidad de sustrato	30
III.6. Peroxidasas de tipo siringilo	32
III.6. Peroxidasas de <i>Arabidopsis</i>	36
III.7. Peroxidasas siringilo en <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
OBJETIVOS	41

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Material vegetal	42
II. Selección de mutantes	42
III. Aislamiento de DNA	43
IV. Condiciones de crecimiento	44
V. Análisis genotípico	45
VI. Ensayos histoquímicos para la detección de ligninas	45
VI.1. Tinción con azul de toluidina	46

VI.2. Tinción de Mäule y Wiesner	46
VII. Microscopía electrónica de transmisión.....	46
VIII. Microscopía electrónica de barrido.....	47
IX. Análisis de las paredes celulares.....	47
IX.1. Obtención de las paredes celulares	47
IX.2. Cuantificación de ligninas con bromuro de acetilo	47
IX.3. Análisis mediante espectroscopia de infrarrojos (FTIR)	48
IX.4 Oxidación de las paredes celulares con nitrobenzono	48
IX.5 Análisis cuantitativo mediante tioacidolisis	49
IX.6. Análisis de hidratos de carbono	50
X. Análisis de la expresión génica.....	50
X.1. Aislamiento y purificación de RNA	50
X.2. Cuantificación de RNA total	51
X.3. Síntesis de DNAc	51
X.4. PCR cuantitativa a tiempo real.	51

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Efecto del bloqueo de la expresión de <i>AtPrx4</i> en plantas de <i>A. thaliana</i>	52
I.1. Localización de la inserción de T-DNA en el gen <i>AtPrx4</i> y de su expresión en diferentes órganos de <i>A. thaliana</i>	52
I.2. Efecto del noqueo de <i>AtPrx4</i> sobre el crecimiento, la composición de la pared y la cantidad de lignina	53
I.3. Alteración de la composición de ligninas en mutantes <i>atprx4</i>	56
I.4 Efecto del bloqueo de la expresión de <i>AtPrx4</i> en los tejidos lignificados del tallo de <i>A. thaliana</i>	59
I.5 Efecto de la supresión de <i>AtPrx4</i> en la redistribución de esqueletos carbonados y en genes implicados en la síntesis de la pared celular	62
II. Efecto del bloqueo de la expresión de <i>AtPrx72</i> en plantas de <i>A. thaliana</i>..	64
II.1. Localización de la inserción de T-DNA en el gen <i>AtPrx72</i> y de su expresión en diferentes órganos de <i>A. thaliana</i>	64

II.2. Efecto del noqueo de la expresión de <i>AtPrx72</i> sobre el crecimiento y la composición de la pared celular de <i>A. thaliana</i>	65
II.3 Efecto de la supresión de <i>AtPrx72</i> sobre el contenido y la composición de las ligninas	70
II.4 Efecto del bloqueo de la expresión de <i>AtPrx72</i> en los tejidos lignificados del tallo de <i>A. thaliana</i>	73
II.5. Análisis mediante microscopía electrónica del efecto del bloqueo de la expresión de <i>AtPrx72</i>	76
II.6 Efecto de la supresión de <i>AtPrx72</i> en la redistribución de esqueletos carbonados y en genes implicados en la síntesis de la pared celular	78
III. Efecto del bloqueo de la expresión de <i>AtPrx52</i> en plantas de <i>A. thaliana</i>.	82
III.1. Localización de la inserción de T-DNA en el gen <i>AtPrx52</i> y de su expresión en diferentes órganos de <i>A. thaliana</i>	82
III.2. Efecto del noqueo de <i>AtPrx52</i> sobre el crecimiento y la composición de la pared celular de <i>A. thaliana</i>	83
III.3. Alteración del contenido y composición de ligninas por efecto del bloqueo de la expresión de <i>AtPrx52</i>	86
III.4. Efecto del bloqueo de la expresión de <i>AtPrx52</i> en los tejidos lignificados del tallo de <i>A. thaliana</i>	89
III.5. Efecto de la supresión de <i>AtPrx52</i> en la redistribución de esqueletos carbonados y en genes implicados en la síntesis de la pared celular	92
CONCLUSIONES.....	97
BIBLIOGRAFÍA.....	99
ANEXO.....	142

Introducción

I. La pared celular vegetal

Las células vegetales presentan, una pared celular muy gruesa compuesta básicamente de celulosa, aunque también contienen otras sustancias, como hemicelulosa, pectinas, proteínas, ligninas, cutina, suberina, sales minerales, etc. (Paniagua y cols. 1997). La pared celular de las plantas representa, aproximadamente, la mitad del carbono orgánico de la biosfera. Muchos organismos son capaces de degradar la pared celular y usar los subproductos de esta degradación para su nutrición (Hazlewood y Gilbert 1998). La pared celular tiene una estructura dinámica, que no sólo es esencial para el mantenimiento de la forma y la rigidez, sino que también juega un papel muy importante en el crecimiento, la comunicación intercelular, la defensa contra el ataque de patógenos, la resistencia mecánica y la interacción con el medio ambiente (Cosgrove 1997, Fry 1995, Borton y cols. 2010).

Los polisacáridos de la pared celular vegetal son los compuestos más abundantes encontrados en la naturaleza y constituyen alrededor de un 90 % de la pared celular vegetal. El polisacárido más característico encontrado en todas las paredes celulares vegetales es la celulosa. Ésta además contiene otros polisacáridos como son pectinas (ramnogalacturonanos y homogalacturonanos) (Harholt y cols. 2010) y hemicelulosas (xiloglucanos, xilanos y glucomananos) (Scheller y Ulvskov 2010). Su composición varía entre distintos grupos filogenéticos (algas, gimnospermas, angiospermas, dicotiledóneas y monocotiledóneas), pero también entre diferentes tejidos de la misma planta (Popper y Fry 2003, Borton y cols. 2010)

Las proteínas estructurales y las enzimas constituyen el 10% restante de la pared celular vegetal y juegan un papel crucial en la estructura y en la arquitectura de la pared, el metabolismo, la elongación celular, la señalización, la respuesta al estrés biótico y abiótico, y en muchos otros procesos fisiológicos (Cosgrove 1997, Fry 1995, Carpita y Gibeaut 1993, Carpita 1996, Rose y Lee 2010).

La pared celular comprende varias capas que van desarrollándose conforme madura la célula vegetal (Figura 1.1). Mencionadas de fuera hacia dentro de la célula, estas son: lámina media, pared celular primaria y pared celular secundaria.

Lámina media

Esta es la capa más externa y en la mayoría de los tejidos vegetales la lámina media es compartida por las células adyacentes. Está constituida por pectinas y proteínas, aunque también se incluyen arabinanos, galactanos, arabinogalactanos y ramnogalacturonanos (Paniagua y cols. 1997).

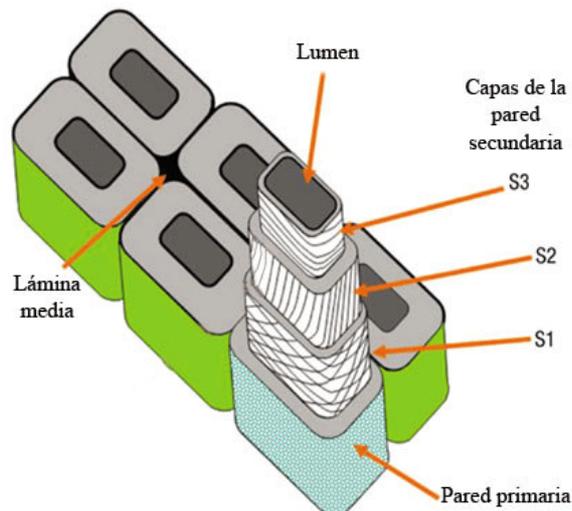


Figura 1.1. Dibujo esquemático de la pared celular vegetal donde se muestran las distintas capas de la pared secundaria (S_1 , S_2 y S_3), la pared primaria y la lámina media. Tomado de Kretschmann (2003).

Pared Celular Primaria

Las células vegetales presentan dos tipos de paredes celulares: la pared celular primaria y la secundaria. La pared celular primaria se sintetiza durante el crecimiento y la elongación celular en los primeros estados del desarrollo y está compuesta de celulosa, hemicelulosa, polisacáridos pécticos y muchas proteínas, entre ellas la extensina, que puede llegar a constituir el 10% de las proteínas estructurales de la pared celular y que es rica en hidroxiprolina y serina. Las microfibrillas de celulosa se encuentran entrecruzadas, lo que facilita el crecimiento y la extensión de la pared primaria. Existen dos tipos de pared celular primaria según la composición de sus polisacáridos. La de tipo I es la más común, mientras que la de tipo II es la típica de las gramíneas (Carpita 1996). Los polímeros no celulósicos de las paredes de tipo I son los xiloglucanos y, constituyendo alrededor del 35 % de la masa de la pared, las pectinas. Las paredes de tipo I se encuentran en todas las dicotiledóneas, en las

monocotiledóneas no gramíneas y en las gimnospermas (Carpita y Gibeaut 1993). Las paredes de tipo II tienen un contenido bajo en pectina y en xiloglucano y alto en arabinoxilano (Carpita 1996). Las paredes de tipo II también contienen mezclas de β -D-glucanos y poseen puentes diferuloilo que entrecruzan las cadenas de xilano y que no están presentes en las paredes celulares de tipo I.

Pared Celular Secundaria

La pared celular secundaria se sintetiza al final del desarrollo y se deposita en células especializadas como los vasos y traqueidas (componentes del xilema), las esclereidas y fibras (componentes del esclerénquima). En comparación con la paredes primarias, las paredes secundarias contienen más celulosa, lo que les confiere una mayor cristalinidad, por lo que son más deseadas en la industria maderera (Minic y Jouanin 2006). Además de la celulosa, la pared secundaria suele contener otras sustancias como las ligninas en los vasos, las traqueidas y el esclerénquima; la suberina en la capa del súber de la corteza y las sales minerales (principalmente carbonatos y silicatos) (Paniagua y cols. 1997). La pared celular secundaria comprende tres subcapas: S_1 , S_2 y S_3 , mencionadas de fuera hacia dentro (Figura 1.1). Estas subcapas son birrefringentes, pues a diferencia de lo que ocurre en la pared primaria, en cada una de ellas, las microfibrillas de celulosa se disponen de una forma ordenada en varios planos de modo que en cada plano todas las microfibrillas son paralelas, cambiando la orientación de las fibrillas de un plano al siguiente (Paniagua y cols. 1997).

Durante la formación de la pared secundaria se sintetizan polisacáridos, como celulosas y hemicelulosas, además de proteínas específicas de la pared. Estudios moleculares han permitido identificar estas proteínas estructurales (Cassab y Varner 1988, Brown y cols. 2005, Yokoyama y Nishitani 2006, Ubeda-Tomas y cols. 2007) que se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: proteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en glicina y arabinogalactano proteínas (Fukuda 1996). Dentro de estas últimas, Motose y cols. (2001), identificaron una proteína de 25 kDa que mediaba la comunicación intercelular requerida para la diferenciación de las traqueidas. Este factor fue denominado “xilógeno” haciendo referencia a su actividad inductora de la xilogénesis. También se han detectado actividades de algunas enzimas hidrolíticas, como poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, fucosidasa y

xiloglucano endo-transglucosilasa, que incrementan su actividad al final del proceso de diferenciación (Stacey y cols. 1995, Pesquet y cols. 2005).

Por otra parte, el proceso más estudiado durante la formación de la pared secundaria ha sido la síntesis de ligninas. La biosíntesis de ligninas implica diferentes etapas, que conducen a la polimerización final de los alcoholes cinamílicos en las paredes celulares. Algunas enzimas como la fenilalanina amonio liasa, la cinamato hidroxilasa, la 4-cumarato CoA ligasa, la *O*-metiltransferasa, la alcohol cinamildeshidrogenasa y las peroxidasa son esenciales para la síntesis de ligninas durante la diferenciación a traqueidas (Higuchi 1985, Hahlbrock y Scheel 1989, Lewis y Yamamoto 1990). Estas proteínas se han utilizado como marcadores de la lignificación durante la diferenciación del xilema (Fukuda 1992).

II. Lignificación

El xilema constituye una vía de baja resistencia para el transporte del agua en plantas vasculares. Este sistema transporta el agua eficazmente desde los lugares de absorción en la raíz hasta las superficies de evaporación en las hojas.

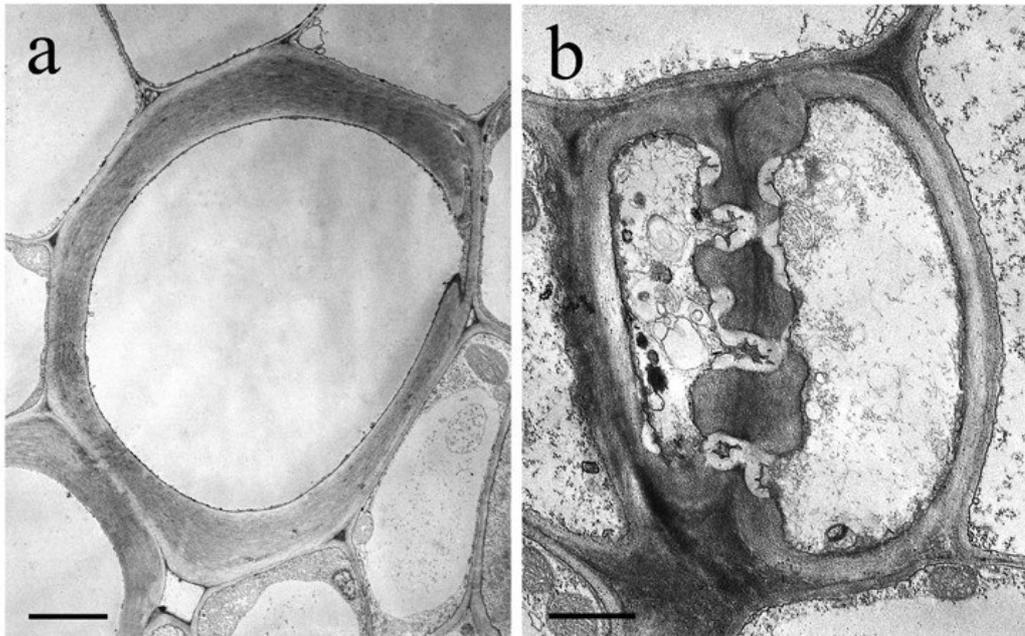


Figura 1.2. Imágenes de microscopio electrónico de un vaso del xilema de *Z. elegans* que ha perdido el citoplasma y en la que se aprecia las paredes celulares secundarias (a), y de un tubo criboso de la misma planta (b). Barras = 3 μ m (en a) y 1 μ m (en b).

La mayoría de las células terminales diferenciadas realizan funciones especializadas antes de morir pero, en el caso del xilema, la adquisición de la funcionalidad implica la muerte celular. Así, las células conductoras no tienen membranas ni orgánulos, y lo que permanece son las paredes celulares engrosadas y lignificadas (Figura 1.2), que forman tubos huecos a través de los cuales el agua puede fluir con una resistencia relativamente baja (Kozela y Regan 2003).

Los elementos diferenciados del xilema (células conductoras de agua) se encuentran revestidos internamente de ligninas (Figura 1.3), que son heteropolímeros fenólicos tridimensionales covalentemente asociados a la matriz polisacáridica de las paredes celulares, creando junto con la hemicelulosa una matriz que recubre las paredes celulares proporcionándoles resistencia e impermeabilidad (Anterola y Lewis 2002, Boerjan y cols. 2003). Las ligninas también se encuentran en otros tejidos de sostén, tales como las fibras del floema y del xilema, y son el resultado de la polimerización oxidativa de tres alcoholes *p*-hidroxicinámicos, en una reacción mediada por lacasas (Zhao y cols. 2013) y peroxidasas (Fagerstedt y cols. 2010), dando lugar a un heteropolímero hidrofóbico ópticamente inactivo (Ralph y cols. 1999). Este proceso de sellado de las paredes celulares vegetales a través de la deposición de lignina, conocido como lignificación, proporciona fuerza mecánica a los tallos y protege a las fibras de celulosa de la degradación mecánica y biológica (Vanholme y cols. 2010). En este contexto, la lignificación de la pared celular vegetal es uno de los principales factores restrictivos en el uso y reciclaje de la biomasa vegetal (Weng y cols. 2008)

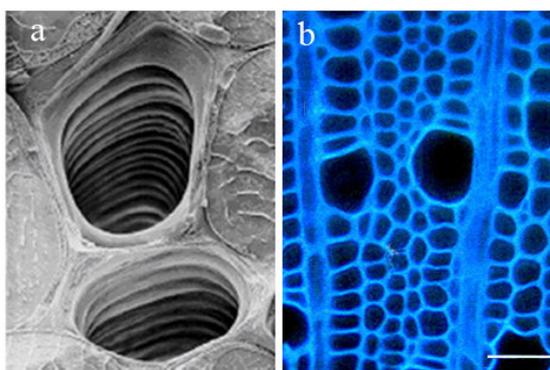


Figura 1.3. Microfotografía electrónica de barrido del xilema de *Z. elegans*, cortesía de Kim Findlay (Roberts y McCann 2000) (a). Localización de las ligninas en el xilema de tallo de álamo, observado bajo luz ultravioleta. La autofluorescencia azul se corresponde con los depósitos de ligninas. La barra representa 50 μ m. Tomado de Ranocha y cols. 2002 (b).

Las ligninas representan el compuesto orgánico más abundante sobre la superficie de la Tierra después de la celulosa, y constituye alrededor del 25% de la biomasa vegetal (Ros Barceló 1997). Se encuentran principalmente en plantas vasculares (Tracheophyta), y se localizan selectivamente en las paredes celulares secundarias de determinadas células, las cuales forman parte de tejidos leñosos, no sólo en los vasos del xilema y las traqueidas, sino también en las fibras y las esclereidas (Ros Barceló 1997). Las ligninas se han identificado en pteridófitos (helechos, licófitos, equisetos), ampliamente consideradas como las primeras plantas vasculares, y es posible que las ligninas hayan jugado un papel clave en la colonización del paisaje terrestre por las plantas durante la transición del Ordovícico al Silúrico, hace de 400 a 450 millones de años. Así, desde el punto de vista de la botánica evolutiva, el fenómeno de la lignificación está asociado a la adquisición de la estructura vascular en las plantas (Novo Uzal y cols. 2012)

Las ligninas presentan también una gran importancia desde un punto de vista económico, ya que la fuerte lignificación que experimenta la madera dificulta y encarece las labores de la industria papelera, aumentando el nivel de los residuos tóxicos indeseables, cuya eliminación sigue siendo objeto de estudio (Gutiérrez y cols. 2007, Yang y cols. 2013). La lignificación también disminuye la calidad nutritiva de las plantas utilizadas como forrajes y pastos al reducir su digestibilidad y, por lo tanto, su utilidad como alimentos. Por último, la lignificación se destaca como factor indeseable durante el procesamiento de ciertas hortalizas en las industrias agroalimentarias ya que les confiere una dureza desagradable a los productos manufacturados.

II.1. Naturaleza, composición y localización de las ligninas

El nombre de ligninas es un término genérico asignado a un numeroso grupo de polímeros aromáticos que se forman como resultado del acoplamiento oxidativo de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (Figura 1.4): el alcohol *p*-cumarílico (I), el alcohol coniferílico (II) y el alcohol sinapílico (III), en una reacción mediada por peroxidasas (Ralph y cols. 2004a).

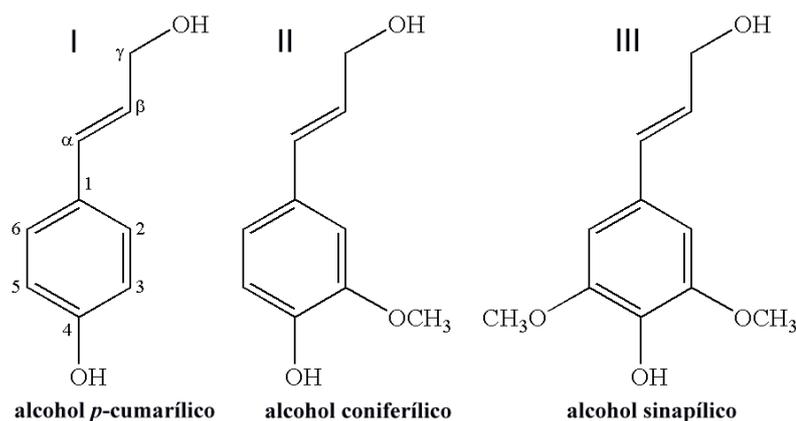


Figura 1.4. Estructuras de los alcoholes cinamílicos.

Esta reacción produce un heteropolímero hidrofóbico, (Ralph y cols. 1999), compuesto por unidades H (*p*-hidroxifenilo) unidades G (guaiacilo) y unidades S (siringilo) provenientes de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, respectivamente. El hecho de que los tres constituyentes monoméricos de las ligninas difieran en el grado de metoxilación (Figura 1.4), y de que para cada uno de los tres bloques de construcción el radical tenga, al menos, cinco formas mesoméricas sugiere que se pueden formar una gran cantidad de subestructuras durante el proceso de polimerización (Ros Barceló y cols. 2004).

En las ligninas, las unidades fenilpropanoide están interconectadas mediante uniones éter y carbono-carbono (Ralph y cols. 2004b), que conducen a las principales subestructuras: β -O-4 aril éter, β -5, fenilcumarano, β - β resinol y 4-O-5 bifenilo éter, así como a otras de menor importancia (Figura 1.5). Los enlaces más frecuentes, β -O-4, se presentan en las subestructuras aril-glicerol- β -aril éter, que son las dianas de la mayoría de los procesos de despolimerización de las ligninas, incluyendo la tioacidolisis. Sin embargo, otros enlaces entre unidades tales como los β -5 (en las subestructuras fenilcumarano), los β - β (en las subestructuras resinol), y los 5-O-4 (en los éteres difenilo) son muy resistentes a la degradación. Además de los monómeros clásicos H, G y S, otras moléculas pueden formar parte del polímero de lignina. Estas subunidades son llamadas no canónicas, entre las que se incluyen ferulatos, hidroxicinamaldehídos (coniferilaldehído y sinapilaldehído), alcoholes dihidrocínámicos y monolignoles acetilados (Ralph y cols. 2008; Wang y cols. 2013). La presencia y la cantidad de cada una de estas subunidades varían entre especies.

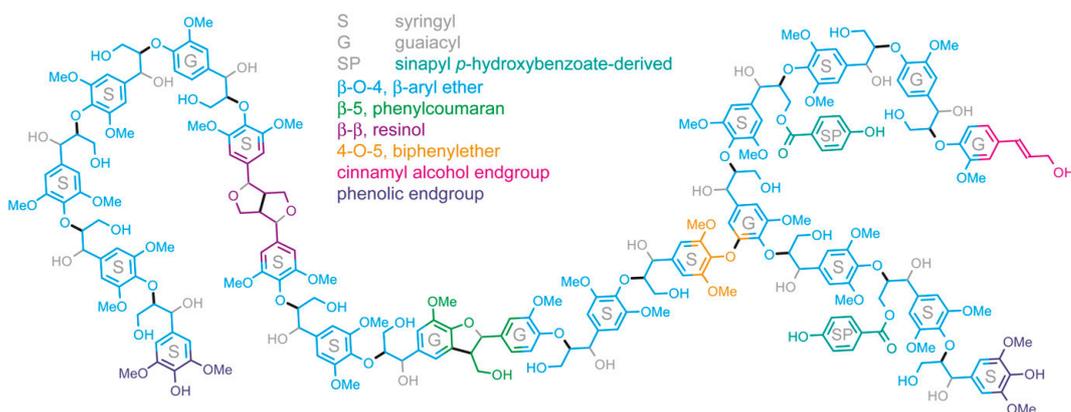


Figura 1.5. Estructura extendida de las ligninas de álamo a partir de datos obtenidos mediante RMN mostrando los diferentes tipos de enlaces. Tomado de Vanholme y cols. (2010).

La composición de las ligninas varían entre especies de plantas, grupos filogenéticos y tejidos. En general, las ligninas de gimnospermas son ricas en unidades G y contienen bajos niveles de unidades H. Por el contrario, en angiospermas, especialmente en dicotiledóneas, las ligninas están formadas por unidades G y S (Weng y Chapple, 2010). En los tallos de *Arabidopsis*, las ligninas presentes en los haces vasculares son ricas en unidades G, mientras que en las fibras interfasciculares predominan las unidades S (Chapple y cols. 1992).

De forma análoga, pueden apreciarse variaciones en la naturaleza de las ligninas encontradas dentro de una misma pared celular, observándose esta heterogeneidad durante la deposición de ligninas tanto en el contenido como en la composición monomérica. En la lámina media y en las esquinas de las paredes celulares, las ligninas están formadas por unidades derivadas del alcohol *p*-cumarílico. Sin embargo, en la pared secundaria predominan unidades derivadas del alcohol coniferílico. Incluso dentro de la pared celular secundaria, la composición monomérica de las ligninas varía entre las diferentes capas, así en S1 predominan unidades H, en S2 unidades G y en S3 unidades S (Thevenin y cols. 2011). Estos datos sugieren que la lignificación está muy regulada durante el crecimiento y su deposición dentro de la pared es un proceso altamente organizado que implica la expresión de un amplio rango de genes en las células lignificadas así como en las células adyacentes (van Parijs y cols. 2010). Además,

Esta variación en la composición de ligninas además es apreciable bajo ciertas condiciones de estrés. Se ha observado que bajo estrés biótico o abiótico se puede inducir la lignificación de la pared celular en células que, en condiciones normales, no lignifican (Kim y cols. 2008). Además, en angiospermas y gimnospermas se observan claras diferencias en la composición de las ligninas en respuesta a un cambio de posición forzado en sus tallos. En angiospermas este cambio de posición provoca un incremento del contenido celulósico en las paredes, junto con una disminución de la cantidad de lignina y un incremento del ratio S/G (Joseleau y cols. 2004). En gimnospermas ocurre al contrario: aumenta el contenido de lignina y celulosa, así como el porcentaje de unidades H (Saito y Fukushima 2005).

Por lo tanto, a nivel químico, así como a nivel de especies, órganos y tejidos, las ligninas son polímeros poco definidos cuya composición monomérica varía enormemente, dependiendo de la velocidad de liberación de los monómeros a la pared celular, las características químicas de los mismos, las condiciones oxidativas que se den dentro de la pared celular y de las circunstancias bióticas y abióticas (Vanholme y cols. 2008). Por ello, la expresión “ligninas” es preferible al uso de “lignina” ya que, probablemente, existe una gran diversidad de estructuras químicas dentro de las ligninas naturales. Este elevado grado de variabilidad estructural depende no sólo del tipo de especie y de tejido sino también del tipo de célula (Ruel y cols. 2009).

II.2. Biosíntesis de ligninas

El proceso de la lignificación y la ruta de biosíntesis de las ligninas presentan numerosas incertidumbres referentes, fundamentalmente, al orden de la ruta y al mecanismo de dicho proceso. Este desconocimiento parcial del proceso puede justificarse, ya que no existe un tejido o especie vegetal donde se haya caracterizado completamente la ruta entera de la biosíntesis de las ligninas. Todo ello motiva que los conocimientos que se tienen, se hayan obtenido del estudio de ciertos pasos específicos en diversas especies y tejidos vegetales, con el fin de intentar clarificar la ruta de síntesis y los mecanismos moleculares que regulan dicho proceso (Boerjan y cols. 2003, Ralph y cols. 2004a, 2008, Vanholme y cols. 2010, Zhao y Dixon 2011).

La ruta fenilpropanoide está formada por una serie de compuestos derivados de la fenilalanina, los cuales desempeñan funciones de defensa, soporte estructural y supervivencia, por tanto se consideran metabolitos secundarios (Vogt 2010). La fenilalanina procedente de la ruta del ácido siquímico es el primer compuesto de la ruta fenilpropanoide, la cual sufre una serie de modificaciones en su anillo aromático (hidroxilaciones y metilaciones) así como esterificaciones y reducciones en su cola de propano (Vanholme y cols. 2010). En la ruta fenilpropanoide también se forman intermediarios que forman parte de otras rutas de síntesis de compuestos necesarios para la planta como son flavonoides, taninos, lignanos, protoantocianidinas, ésteres del ácido sinápico, etc... (Fraser y Chapple 2011).

Las plantas son los únicos organismos vivos capaces de conducir el carbono desde el metabolismo primario al secundario a través de la biosíntesis de ligninas, y se acepta que la adquisición evolutiva de la ruta fenilpropanoide ha jugado un papel clave en la capacidad de las plantas para colonizar la Tierra, no sólo porque uno de los productos de la ruta (las ligninas) sirve para fortalecer los órganos aéreos de la planta, sino también porque otros productos (los flavonoides) actúan como protectores contra la radiación UV. Sin embargo, una vez que las ligninas se han depositado en la pared celular, las plantas no tienen la maquinaria enzimática necesaria para poder reciclar esa fuente de carbono, al contrario que en el caso de otros componentes de la pared celular vegetal como son los β -D-glucanos que forman parte de las hemicelulosas (Fincher 2009).

La biosíntesis de las ligninas se desarrolla a través de una larga secuencia de reacciones (Figura 1.6) que implican:

i) La ruta del ácido siquímico, que produce L-fenilalanina y L-tirosina y que se inicia con fosfoenol piruvato (PEP, un intermediario de la glucólisis) y eritrosa 4-fosfato (un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato) (Tzin y Galilli 2010).

ii) La ruta común fenilpropanoide, desde L-fenilalanina (y/o L-tirosina) hasta *p*-hidroxicinamoil-CoA. Las enzimas que participan en esta ruta son la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), la cinamato-4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.13.11), la *p*-cumarato-3-hidroxilasa (C3H), y las *O*-metil-transferasas (OMT) dependientes de *S*-adenosil-*L*-metionina, tales como la cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa (CCoAOMT, EC 2.1.1.104) y la *p*-hidroxicinamato CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12). Los productos finales de esta ruta, los ésteres CoA de los

ácidos cinámicos, son los precursores de las ligninas, pero también de otros compuestos fenólicos como los flavonoides y los taninos, que se acumulan en grandes cantidades en las células vegetales.

iii) La ruta específica de la biosíntesis de las ligninas, que conduce el *p*-hidroxicinamoil-CoA hacia la síntesis de los alcoholes cinamílicos. Estas dos reacciones son catalizadas por las enzimas *p*-hidroxicinamoil-CoA reductasa (CCR, EC 1.2.1.44) y la *p*-hidroxicinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) (EC 1.1.1.195). Intercalada entre estos dos pasos reductores hay una reacción catalizada por la ferulato 5-hidroxilasa (F5H), que está acoplada con una OMT específica, ácido cafeico *O*-metiltransferasa (COMT), y que permite la síntesis de unidades siringilo (Fraser y Chapple 2011)

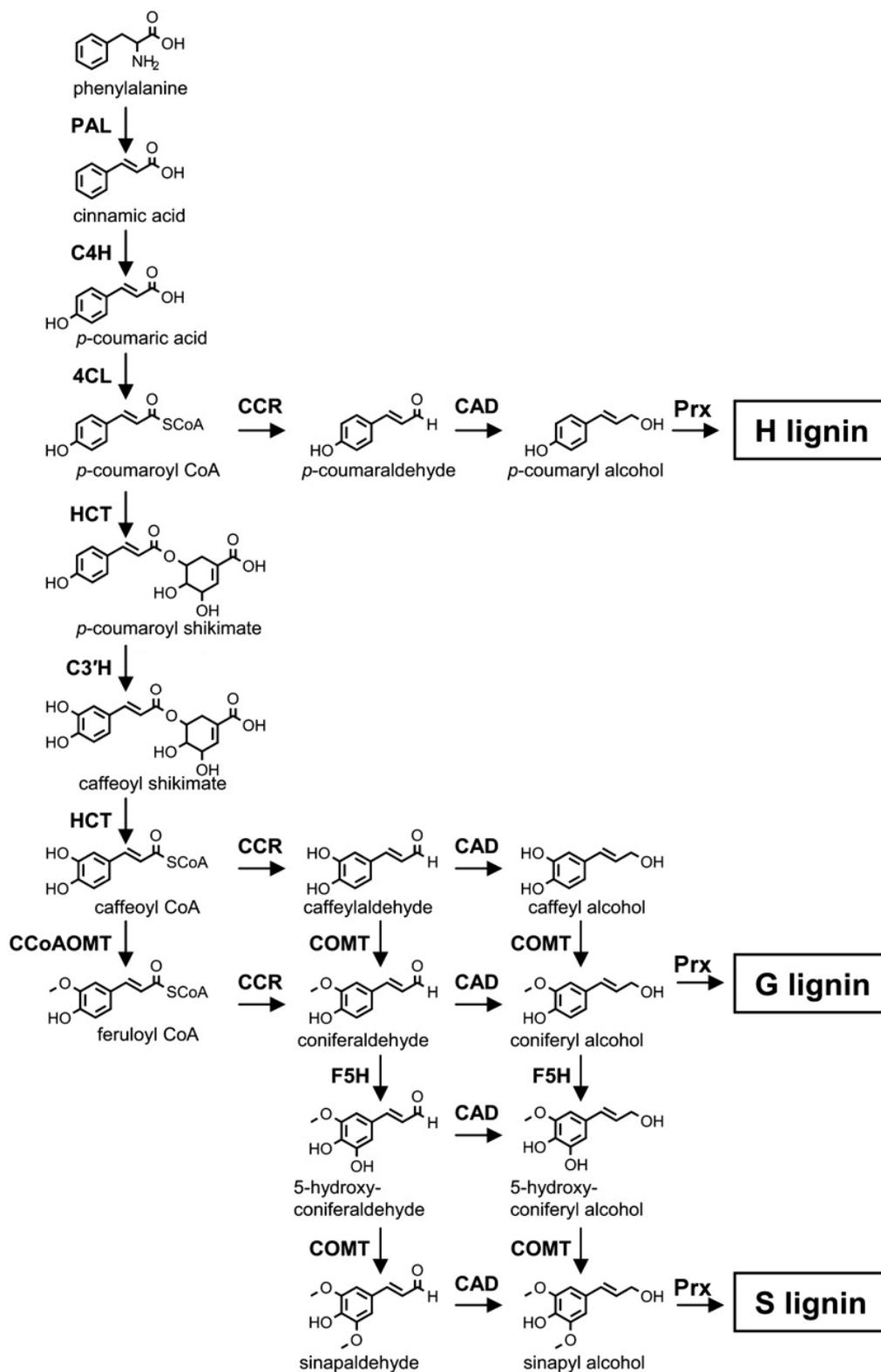


Figura 1.6. Ruta de biosíntesis de los monolignoles: PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato CoA ligasa; HCT: hidroxicinamoil CoA transferasa; C3'H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; CCoAOMT: cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa; CCR: cinamoil-CoA reductasa; COMT: ácido cafeico *O*-metiltransferasa; CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; F5H: ferulato 5-hidroxilasa; Prx: Peroxidasa. Modificado de Li y cols. (2010).

II.3. Transporte de monolignoles

Tras su biosíntesis en el citosol los monolignoles deben transportarse a la pared celular para ser oxidados e incorporados al polímero de lignina. Los monolignoles pueden encontrarse libres o unidos a azúcares formando 4-O- β -D-glicósidos. La glicosilación de monolignoles está catalizada por glicosiltransferasas (Steeves y cols. 2001) mientras que su desglicosilación es llevada a cabo por β -glucosidasas localizadas en la pared celular (Burmeister y Hosel 1981). En un primer momento se pensó que las glicosiltransferasas y las glucosidasas eran las responsables del almacenamiento y transporte de los monolignoles (Escamilla-Treviño y cols. 2006). Kaneda y cols. (2008) usando fenilalanina marcada radiactivamente observaron que la radiación estaba presente en monolignoles libres y en la pared celular, lo que sugiere que los monolignoles libres son la forma utilizada para el transporte. Recientemente se ha demostrado que el grado de glicosilación de los monolignoles determina su compartimentalización subcelular (Miao y Liu 2010), así como que los glucósidos de los monolignoles son la forma de almacenamiento pero no los precursores directos para la síntesis de ligninas (Chapelle y cols. 2012), ni para el transporte de los mismos. Se podría decir que la glicosilación es un prerrequisito para el almacenamiento en la vacuola, mientras que las formas no glicosiladas son directamente exportadas a la pared celular.

En relación al transporte de los monolignoles hacia la pared celular, se puede realizar de las siguientes maneras:

1. Exocitosis a través de vesículas
2. Difusión pasiva
3. Transporte activo mediante proteínas transportadoras de tipo ABC

El transporte activo es el más aceptado para el paso de monolignoles desde el citosol a la vacuola o a la pared celular (Miao y Liu. 2010). Se han observado patrones de expresión similares entre transportadores ABC y genes involucrados en la biosíntesis de ligninas (Alejandro y cols. 2012). Kaneda y cols. (2011) analizaron una serie de transportadores de tipo ABC cuya expresión estaba relacionada con la biosíntesis de ligninas y observaron que estos transportadores se expresaban en gran medida en los haces vasculares o en las fibras interfasciculares en *Arabidopsis*. Esta observación, junto con la realizada por Alejandro y cols. (2012) en la cual un transportador ABC podría ser

específico para el transporte de un alcohol hidroxicinámico, podrían explicar la variación en la composición de las ligninas que se da entre los haces vasculares, ricos en unidades G, y las fibras interfasciculares, ricas en unidades S (Wang y cols. 2013)

II.4. La etapa de polimerización

La etapa de polimerización es el último paso en el proceso de la biosíntesis de ligninas a partir de los alcoholes hidroxicinámicos. Esta etapa ocurre a través de la oxidación de los de los alcoholes hidroxicinámicos por las peroxidasas de clase III dando lugar a la formación de radicales fenoxilo, seguido de un acoplamiento radical entre los mismos, formando dímeros (dilignoles). Lo más común es que estos dímeros oxidados se unan con otros monómeros de alcoholes hidroxicinámicos y se produzca de esta manera la formación de un polímero en crecimiento (Figura 1.7). Este proceso recibe el nombre de **polimerización lineal** (Vanholme y cols. 2010), la cual se contrapone a la denominada **polimerización en masa** (*bulk polimerization*) en la cual se produce el acoplamiento oxidativo de dos oligómeros de lignina (Brunow y cols. 1998). La polimerización lineal es típica en ligninas formadas por unidades S y G, mientras que la polimerización en masa es más común en ligninas donde predominan las unidades de tipo G (Wagner y cols. 2009). Esta diferencia en la polimerización se debe en parte a la presencia de unos u otros alcoholes hidroxicinámicos. Así, en presencia de alcohol coniferílico predomina la polimerización en masa, mientras que si se añade una mezcla de alcohol sinapílico y coniferílico predomina la polimerización lineal, aunque finalmente cuando se consumen los monómeros de ambos alcoholes se produce la polimerización en masa (Demont-Calet y cols. 2010).

Los alcoholes hidroxicinámicos son oxidados en una reacción catalizada por peroxidasas de clase III, las cuales son exportadas hacia el apoplasto donde se producirá la oxidación de los monolignoles. Esta reacción de oxidación es dependiente de H_2O_2 (Nose y cols. 1995, Ros Barceló y Pomar 2001) suministrado por una enzima de tipo NADPH oxidasa (Ros Barceló 1998a). Los dilignoles no son los productos finales de la ruta y pueden ser oxidados de nuevo por peroxidasas facilitando el acoplamiento entre ellos o con otros monolignoles.

Lewis y Yamamoto (1990) establecieron cuatro criterios básicos que deberían cumplir aquellas enzimas implicadas en la polimerización de los alcoholes hidroxicinamílicos en la pared celular. Estos criterios son:

- i) mostrar una especificidad de sustrato por los alcoholes hidroxicinamílicos
- ii) presentar una localización subcelular en la pared celular
- iii) conocerse su estructura primaria
- iv) presentar una correlación temporal con las fases de lignificación activa de la pared celular.

A estos cuatro criterios, Ros Barceló (1997) añadió dos nuevos:

- v) que la enzima presente una extensa distribución dentro de todas las especies de plantas vasculares hasta ahora conocidas
- vi) que la enzima presente una alta afinidad para los alcoholes hidroxicinamílicos durante su oxidación a compuestos de tipo lignina.

De forma general se ha considerado que peroxidasas y lacasas son las principales enzimas implicadas en esta etapa de polimerización, ya que presentan una correlación tanto espacial como temporal con la lignificación de la pared celular (Ros Barceló 1997). En el caso de las lacasas, éstas presentan una baja afinidad por los alcoholes hidroxicinamílicos, una incapacidad manifiesta de formar compuestos altamente polimerizados de tipo lignina y, en muchos casos, una falta de correlación cuantitativa entre los niveles de la enzima y la lignificación. A pesar de esos inconvenientes se han encontrado mutantes *knock-out* de lacasas que muestran una disminución en el contenido de ligninas (Berthet y cols. 2011). En el caso de las peroxidasas resulta difícil imaginar que una única isoenzima sea la responsable en exclusiva de un proceso tan complejo y organizado como es la polimerización de los alcoholes hidroxicinamílicos a ligninas. No obstante, las peroxidasas reúnen bastantes de los requisitos previamente definidos. Así, estas enzimas muestran una gran afinidad por los alcoholes hidroxicinamílicos durante su oxidación a compuestos de tipo lignina, muestran una correlación cuantitativa con la lignificación de la pared celular (Shigeto y cols. 2013) y, por último, están presentes en altos niveles en los tejidos lignificantes de todas las plantas vasculares (Novo-Uzal y cols. 2012).

La teoría más aceptada es que las lacasas participan en los primeros estadios de la lignificación (Zhao y cols. 2013), mientras que las peroxidasas son las responsables de la lignificación en los estadios intermedios y finales, cuando se genera H_2O_2 por parte de las células del parénquima en respuesta a la entrada en apoptosis de las células en lignificación (Pesquet y cols. 2013)

II.5. Lignificación en la célula vegetal

La biosíntesis de monolignoles comienza en el interior de los plastidios, donde se encuentran las enzimas que participan en la ruta del siquimato (Rippert y cols. 2009). Como productos de esta ruta se forman la fenilalanina y la tirosina, que son los compuestos iniciales de la ruta fenilpropanoide. Las enzimas de dicha ruta presentan diferentes localizaciones, mientras que las enzimas C4H, C3'H y F5H pertenecientes a la familia de proteínas P450 se encuentran localizadas en la superficie externa del retículo endoplasmático (Li y cols. 2008), las enzimas PAL, CAD, COMT, CCoAOMT y 4CL se localizan en vesículas derivadas del aparato de Golgi que se encuentran en el citosol (Takabe y cols. 2001). Esta compartimentalización de las enzimas implicadas en la biosíntesis de monolignoles, así como la localización exclusiva en los plastidios de las enzimas de la ruta del siquimato tiene dos funciones, eliminar los intermediarios aromáticos que son fitotóxicos y mejorar la eficacia de la transformación de los diferentes intermedios de reacción (Liu 2012). Los monolignoles sintetizados pueden bien ser transportados al apoplasto y allí ser oxidados por peroxidasas o lacasas; o bien ser glicosilados, posteriormente transportados a la vacuola posiblemente por transportadores de tipo ABC (Figura 1.8). La lignificación comienza en las esquinas celulares, la lámina media y la capa S1 de la pared secundaria, extendiéndose después por el resto de la pared secundaria hacia el lumen. La lignificación de la lámina media y la pared primaria comienza después de la formación de la pared secundaria, mientras que la lignificación de esta última normalmente empieza cuando la formación de la pared secundaria se ha completado (Donaldson 2001, Möller y cols. 2006).

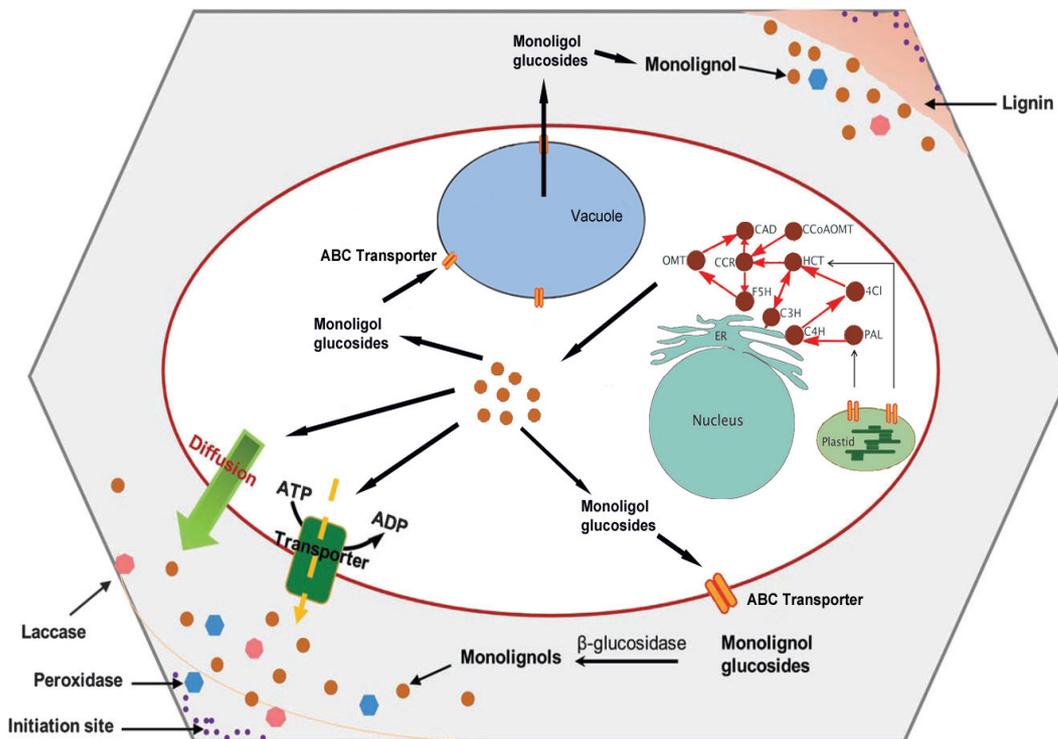


Figura 1.8. Esquema de la biosíntesis de monolignoles, su transporte e iniciación de la polimerización de la lignina dentro de la célula vegetal. En la biosíntesis de monolignoles a partir de fenilalanina y siquimato están implicadas enzimas citosólicas (PAL, HCT, 4CL, CCR, CAD, CCoAOMT y COMT) y enzimas unidas a la membrana del retículo endoplasmático (F5H, C3'H y C4H). Una vez sintetizados los monolignoles pueden pasar al apoplasto o ser glicosilados. Los monolignoles glicosilados se almacenan en las vacuolas para después ser transportados al apoplasto o directamente pasan a la pared celular. Una vez en la pared son desglucosilados para que puedan ser oxidados por peroxidasas y laccasas. Modificado de Liu (2012) y Wang y cols. (2013).

Debido a que la lignificación comienza en la región más alejada del protoplasto, se ha sugerido que haya puntos de inicio ligados a regiones específicas de la pared celular, donde comienza la polimerización. Estos sitios de inicio deberían estar en la pared durante su formación, en vez de depender de la difusión de las enzimas implicadas hacia los lugares de lignificación. En las paredes celulares de *Arabidopsis* y de monocotiledóneas herbáceas se han encontrado cantidades significativas de ferulato, el cual puede formar dímeros o bien polimerizar con otros compuestos fenólicos y formar uniones con polisacáridos o proteínas estructurales de la pared celular, formando de esta manera núcleos para la polimerización de las ligninas (Ralph 2010). Otros candidatos para ser sitios de inicio son las llamadas proteínas dirigentes, que son proteínas no enzimáticas que dirigen el acoplamiento radical en la síntesis de los polímeros de lignina (Davin y cols. 2008), aunque esta teoría no es compartida por la mayoría de los investigadores que estudian la lignificación.

El inicio de la polimerización de la lignina, así como la deposición espacial de un tipo u otro de lignina también depende de las enzimas responsables de la oxidación de los monolignoles. Estas enzimas se localizan en la lámina media, esquinas de las paredes celulares y en la pared celular secundaria, aunque se desconoce su distribución y movimiento dentro de la pared celular durante el proceso de lignificación (Figura 1.8). Las condiciones dentro de la pared celular son muy diversas dando lugar a pequeños microambientes que pueden influir en el acceso de proteínas, sustratos enzimáticos o incluso actividades catalíticas dentro de la propia pared celular (Lee y cols. 2011)

II.6 Restricciones en el proceso de lignificación

El mecanismo de polimerización, tal como actualmente es conocido (Freudenberg y cols. 1965, Hatfield y Vermerris 2001), impone ciertas restricciones al proceso de lignificación. Si los sustratos (los monolignoles y el H_2O_2) y las enzimas son suministrados por las células del parénquima vecinas a las células del xilema después de que estas entren a apoptosis (Smith y cols. 2103), se puede esperar un gradiente de difusión de los bloques de lignina así como del H_2O_2 desde la membrana plasmática de las células del parénquima hasta las paredes celulares secundarias de los vasos del xilema. Esto produce dos zonas topográficas claramente definidas en las paredes celulares lignificantes:

1.- Una caracterizada por elevados niveles de peroxidasa y alta difusión de sustratos, y localizada en la pared celular primaria de las células del parénquima del xilema y de los vasos.

2.- Otra caracterizada por bajos niveles de peroxidasa y baja difusión de sustratos, y localizada más allá de las paredes celulares primarias, como en los engrosamientos de la pared celular secundaria de los vasos del xilema.

Esto produce dos tipos de polimerización: una rápida (en la pared celular primaria) y la otra lenta (en la pared celular secundaria). La polimerización rápida, como probablemente ocurre en la lámina media y en las paredes celulares primarias, favorece el acoplamiento C-C de los monolignoles formando polímeros muy ramificados, ricos en enlaces interunitarios β -5, β -1, β - β , 5-5 y 5-O-4. Este tipo de polimerización rápida da lugar a lo que se conoce como *bulk polymerization* mencionada en el apartado II.4. En contraste, la polimerización

que se produce en las paredes celulares secundarias es la denominada polimerización lineal, que favorece el acoplamiento β -O-4 de los monolignoles dando lugar a polímeros relativamente lineales (Lai y Sarkanen 1975), un proceso favorecido a pH 5,5 (Grabber y cols. 2003), el pH de la pared celular secundaria de los elementos del xilema (Roberts y Haigler 1994). Así, las ligninas ricas en unidades H se depositan principalmente en las paredes celulares primarias y están fuertemente entrecruzadas (Terashima y Fukushima 1988, Chabannes y cols. 2001, Ruel y cols. 2002), mientras que las ligninas ricas en unidades G y S son principalmente depositadas en las paredes celulares secundarias, y el polímero formado es principalmente lineal, en el que los esqueletos de los monolignoles se unen por enlaces β -O-4 (Chabannes y cols. 2001, Ruel y cols. 2002).

II.7 Regulación de la lignificación

Las células lignificadas constituyen un importante sumidero de carbono y además no pueden expandirse debido a la deposición de lignina, por lo que la lignificación ocurre después de que la célula se haya dividido y aumentado de tamaño. Dado el gran coste metabólico que conlleva la síntesis del polímero de lignina, junto con la incapacidad de las células vegetales para utilizarlo como fuente de carbono y las propiedades que confiere a las células lignificadas, el proceso de lignificación está fuertemente regulado a nivel temporal y espacial.

La regulación de la biosíntesis de ligninas se ha estudiado principalmente mediante análisis de los promotores de los genes implicados. Mediante análisis de delección en el promotor del gen *PAL* se identificaron los elementos *cis* críticos para su expresión específica en los distintos tejidos.

factores transcripcionales MYB es una de las clases más abundantes en las plantas y la subfamilia que contiene el dominio R2R3 de unión al DNA es la más grande (Figura 1.10) (Stracke y cols. 2001). El potencial de las proteínas R2R3-MYB de unirse a los elementos AC y regular la lignificación se demostró por primera vez en *Antirrhinum majus* (Tamagnone y cols. 1998). Cuando alguna de las proteínas *AmMYB308* o *AmMYB330* se sobreexpresa en tabaco se acumulan menos compuestos fenólicos que en las plantas control y se reduce la cantidad de ligninas en los tejidos vasculares.

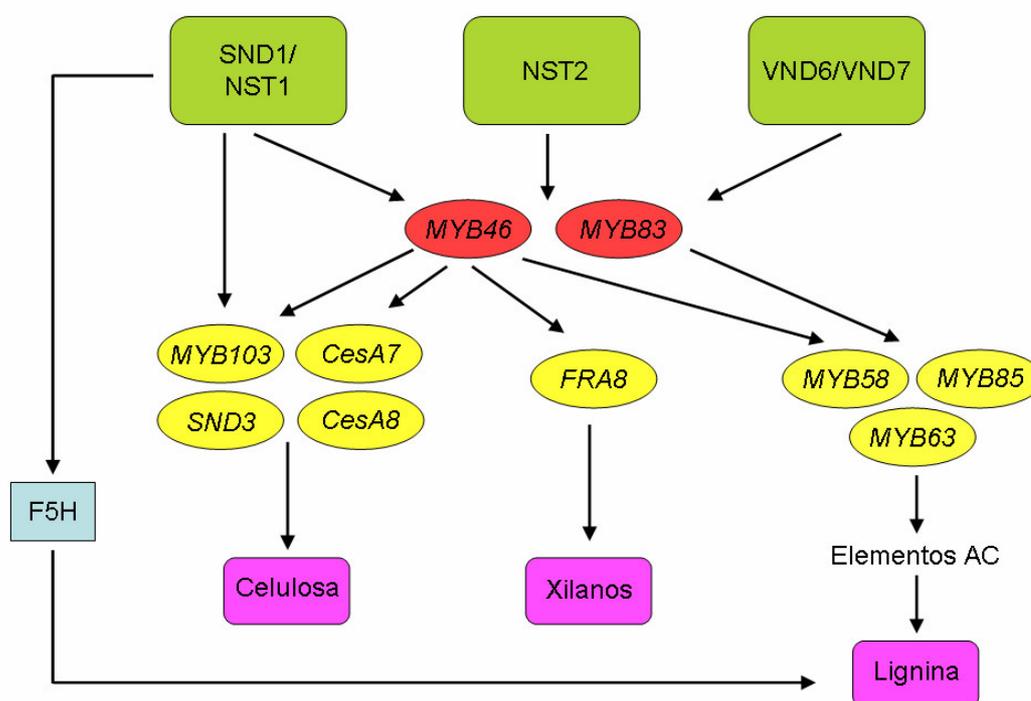


Figura 1.10. Esquema de la regulación transcripcional de la biosíntesis de la pared celular en *A. thaliana*.

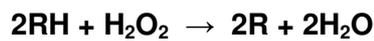
En *Arabidopsis* existen tres factores de transcripción implicados directamente en la biosíntesis de ligninas, ya que son capaces de unirse a los elementos AC presentes en los promotores de los genes que codifican para las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de los monolignoles (*MYB58*, *MYB63* y *MYB85*). En el caso de *MYB58*, éste se puede unir a los promotores de todos los genes de la ruta fenilpropanoide excepto al de *F5H* (Zhou y cols. 2009). No sólo los factores MYB están involucrados en la regulación de la biosíntesis de ligninas de manera directa (actuando sobre los genes de la ruta fenilpropanoide) o indirecta (modificando la expresión de otros factores de transcripción) sino que existen otros factores de transcripción que desempeñan un papel muy

importante en el proceso de lignificación. Estos factores son proteínas con dominio tipo NAC, los cuales actúan como reguladores maestros (*master regulator*), e incluyen los factores *NST1* (NAC Secondary wall Thickening promoting factor1), *NST2*, *SND1* (Secondary wall-associated NAC Domain protein1), *VND6* (Vascular-related NAC Domain6) y *VND7* (Zhong y cols. 2012). *VND6* y *VND7* regulan la biosíntesis de la pared celular en el metaxilema y el protoxilema respectivamente (Kubo y cols. 2005), mientras que *NST1/SND1* regulan la biosíntesis de la pared celular en las fibras del xilema y las fibras interfasciculares (Mitsuda y cols. 2007, Zhong y cols. 2007). *SND1* actúa directamente sobre los factores *MYB103*, *MYB46*, *MYB83* y *SND3* (Zhong y cols. 2008). *MYB46* y *MYB83* regulan la expresión de *MYB58*, *MYB63* y *MYB85*, que participan directamente en la regulación de los genes de biosíntesis de las ligninas mediante su unión a elementos AC, excepto en el caso de F5H que es directamente regulada por *SND1* (Zhou y cols. 2009). *MYB46* está implicado en la regulación de la biosíntesis de los tres principales componentes que constituyen las paredes celulares vegetales, ya que regula genes implicados en la biosíntesis de celulosa (*CesA7*, *CesA8*), factores de transcripción que regulan directamente esta ruta (*MYB103* y *SND3*) y genes que intervienen en la biosíntesis de xilanos (*FRA8*) (Kim y cols. 2014) (Figura 1.10). Estudios recientes han demostrado que además existen factores de transcripción de la familia VND que están involucrados tanto en la síntesis de la pared celular como en la muerte celular programada, por lo que la acción conjunta de esta familia de factores de transcripción regularían la formación de los vasos (Zhou y cols. 2014)

También existen inhibidores de los genes implicados en la biosíntesis de la pared celular como es el caso de *MYB52* y *hb5* (Cassan-Wang y cols. 2013) o el factor de transcripción *MYB75*, que reprime la biosíntesis de pared celular, actuando sobre los genes de biosíntesis de celulosa, xilanos y ligninas (Bhargava y cols. 2010). Existen otros factores transcripcionales que tienen la capacidad de regular la expresión de algunos genes de la biosíntesis de ligninas. Se ha encontrado en tabaco un miembro de la familia LIM (*NtLIM1*) capaz de unirse a un elemento AC implicado en la expresión específica en el xilema de genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis de ligninas (Kawaoka y cols. 2000).

III. Peroxidasas

Las peroxidasas (H_2O_2 : donador de hidrógeno: H_2O_2 oxidorreductasas) son hemoproteínas que catalizan la oxidación monoeléctrica de diferentes sustratos a expensas del H_2O_2 según la siguiente reacción;



Se encuentran ampliamente distribuidas en el Reino Vegetal: Rodófitos (Collen y cols. 1994), Clorófitos (Vanden Driessche y cols. 1984; Weger 1997), Briófitos (Matlok y cols. 1989), Pteridófitos (Bakardjieva y cols. 1996) y en todos los Espermatófitos estudiados (Siegel 1993); incluso aparecen en Euglenófitos (Shigeoka y cols. 1980), pertenecientes al Reino Protozoo.

Las peroxidasas se clasifican en dos grandes superfamilias, una que incluye a las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas, y otra superfamilia no relacionada estructuralmente con la anterior constituida por las peroxidasas animales (Welinder 1992, Hiraga y cols. 2001). A su vez, dentro de la superfamilia de las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas se han definido tres clases en base a las diferencias estructurales que existen entre ellas:

- Clase I: está compuesta por la citocromo c peroxidasa mitocondrial de levaduras, la ascorbato peroxidasa cloroplástica y citosólica de plantas superiores y las peroxidasas bacterianas (Jespersen y cols. 1997). No poseen naturaleza glicoproteica, están localizadas en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol, y muestran una moderada especificidad de sustrato para el ácido ascórbico. Adicionalmente, estas peroxidasas de la clase I son inhibidas por reactivos que contienen el grupo tiol como el *p*-cloromercurobenzoato y, en general, son consideradas como muy termolábiles.

- Clase II: agrupa a todas las peroxidasas fúngicas de secreción (manganeso peroxidasas).

- Clase III: contiene todas las peroxidasas vegetales de secreción y muestran características distintas a otras peroxidasas vegetales. Son de naturaleza glicoproteica, están localizadas en las vacuolas y en las paredes celulares. Estas peroxidasas muestran una baja especificidad de sustrato, con una moderada, pero notable, afinidad por el alcohol coniferílico, además de

presentar una inusual estabilidad térmica. Todas estas características las distinguen de las ascorbato peroxidasas vegetales (clase I).

III.1. Naturaleza y estructura

Las peroxidasas vegetales de secreción (EC.1.11.1.7) son glicoproteínas cuyo peso molecular generalmente está comprendido entre 28 y 60 kDa (Hiraga y cols. 2001). Contienen como grupo prostético una molécula de protohemina IX (hemo b). En su estado nativo, el átomo de hierro se encuentra en el estado de oxidación formal +3 [Fe(III)]. Este hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno pirrólicos del grupo hemo y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina de la proteína, que se ha conservado durante la evolución. La sexta posición de coordinación se encuentra libre determinando así el estado de alto espín para el hierro (Banci 1997). El grupo prostético (Figura 1.11) resulta esencial para la actividad enzimática ya que su eliminación provoca la total inactivación de la enzima (Chibbar y cols. 1984).

En su estructura tridimensional tienen 10 hélices α y algunas láminas β . El grupo hemo está localizado en una cavidad entre dos hélices α antiparalelas. Hay residuos conservados que tienen un papel importante, como la histidina distal y la arginina adyacente; y la histidina proximal que se encuentra coordinada con el Fe^{3+} y el hidrógeno unido al ácido aspártico.

En todas las peroxidasas de clase III conocidas hasta el momento se encuentran dos átomos estabilizadores de Ca^{2+} , uno distal y otro proximal. Además, el Ca^{2+} también es considerado un activador de las peroxidasas vegetales de secreción (Iori y cols. 1995, Converso y Fernández 1996) y las cadenas a las que están unidos están altamente conservadas (Welinder y cols. 2002).

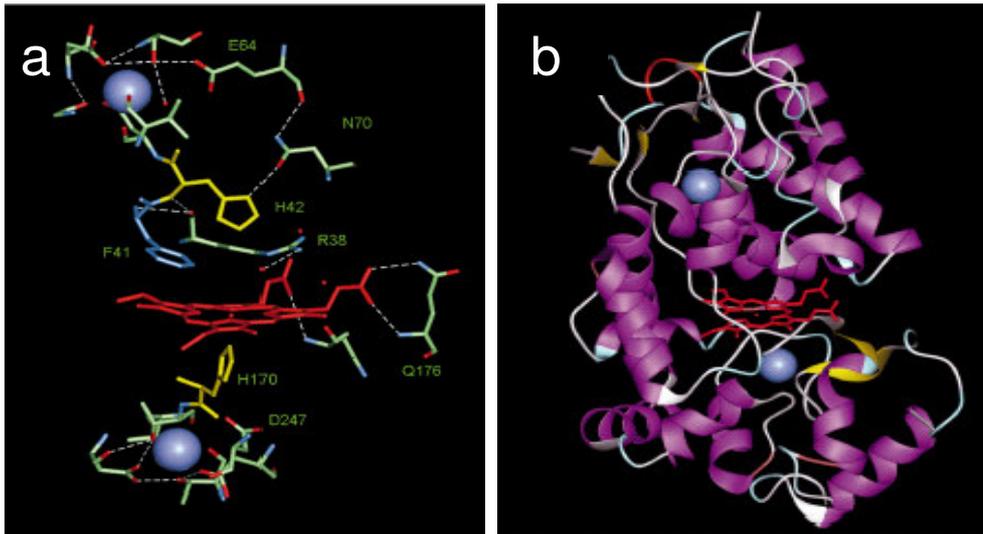


Figura 1.11. Ordenación espacial del centro activo de las peroxidases. El grupo hemo (en rojo) está coordinado por la histidina proximal, H170, y el sexto sitio de coordinación está vacante (a). Estructura tridimensional de la isoenzima C de la peroxidasa de rábano (HRP C); las regiones plegadas helicoidalmente se muestran en púrpura, y las láminas- β en amarillo (b). El grupo hemo se encuentra entre los dominios distal (arriba) y proximal (abajo) de la enzima. Los dos sitios de unión al calcio se muestran como esferas azules. Tomado de Smith y Veitch (1998).

La presencia de cuatro puentes disulfuro ligados a cuatro pares de residuos invariables de cisteína están conservados en todas las peroxidases de clase III, además de un puente salino en los residuos invariables de Asp y Arg importante para la unión entre los dominios N- y C- terminal durante el plegamiento de la proteína (Veitch 2004).

La mayoría de los RNAm de las peroxidases vegetales codifican un péptido señal de 19 a 31 residuos de entrada al retículo endoplásmico que dirige a la proteína hacia la ruta de secreción. Algunos RNAm, como en el caso de la peroxidasa de rábano C y la peroxidasa 1 de cebada, también poseen un propéptido carboxi-terminal que puede ser responsable de su deposición en las vacuolas (Welinder 1992, Carpin y cols. 1999).

La glicosilación de la enzima varía entre el 0 y el 25 %, siendo los principales azúcares la *N*-acetilglucosamina, la manosa, la fucosa y la xilosa. La mayoría de los oligosacáridos tienen un alto contenido en manosa (Gray y cols. 1996, Yang y cols. 1996, McMannus y Ashford 1997, Wilson 2002). La glicosilación ocurre en la superficie de los giros que conectan sobretodo las hélices F' y F'' , de tal forma que el glicano se presenta hacia el exterior de la molécula (Veitch 2004). La glicosilación es uno de los factores principales que

determinan la inusual estabilidad térmica de las peroxidasas vegetales de secreción (McEldoon y Dordrick 1996) ya que la eliminación de estos oligosacáridos normalmente afecta la cinética de las peroxidasas, su estabilidad térmica, su resistencia a las proteasas (por ejemplo tripsina), su estructura secundaria, y sus propiedades inmunológicas (Sánchez-Romero y cols. 1994, Tams y Welinder 1995, Duarte-Vázquez y cols. 2003).

III.2. Funciones de las peroxidasas de clase III

A diferencia de lo que ocurre con las peroxidasas de clase I, las cuales están involucradas en la detoxificación del H_2O_2 (Sgobba y cols. 2014) y las de clase II que participan en la degradación de restos de suelo asignar una función particular a las de clase III es bastante más complejo, debido al gran número de genes presentes, isoenzimas y sus dos posibles ciclos catalíticos (Passardi y cols. 2005, Almagro y cols. 2009).

Las peroxidasas de clase III se encuentran involucradas en el metabolismo de la pared celular (Ros Barceló y Pomar 2001), metabolismo de las auxinas (Cosio y cols. 2008), cicatrización de heridas (Allison y Schultz 2004), detoxificación del H_2O_2 , detoxificación de compuestos y defensa contra patógenos (Daudi y cols. 2012). Además, las peroxidasas generan especies reactivas de oxígeno (EROs) (Passardi y cols. 2004) las cuales actúan en diferentes respuestas medioambientales y procesos de desarrollo incluyendo el estadillo oxidativo, la respuesta hipersensible o la elongación celular (Bolwell y cols. 2002; Liskay y cols. 2004; Bindschedler y cols. 2006). Además las EROS generadas por las peroxidasas pueden actuar como mensajeras en la ruta de transducción de señales (Laloi y cols. 2004) durante la respuesta a estrés, división y elongación celulares y muerte celular programada (Bethke y Jones 2001, Foreman y cols. 2003, Foyer y Noctor. 2005).

La diversidad de procesos catalizados por las peroxidasas, así como el gran número de genes sugiere que algunos de los miembros de esta familia presenten una función especializada (Cosio y Dunand 2009). La presencia de regiones conservadas y regiones variables en estas proteínas pueden explicar la especificidad de ciertas peroxidasas. De hecho, algunos autores han demostrado la aparición y desaparición de isoformas de peroxidasas durante un proceso

concreto y en una zona en particular (Loukili y cols. 1999, Allison y Schultz 2004).

III.3. Papel fisiológico de las peroxidasas en la lignificación

Aunque en un principio puede considerarse que las peroxidasas son las candidatas más adecuadas para realizar el proceso de polimerización de los alcoholes hidroxicinámicos, diversos estudios realizados con plantas transgénicas de tabaco muestran que una reducción significativa en la expresión de una isoenzima ácida de peroxidasa no viene acompañada de una reducción de la lignificación (Lagrimini y cols. 1997), y arrojan ciertas dudas sobre la participación exclusiva de las peroxidasas ácidas en este proceso.

Otro aspecto que deberían cumplir las enzimas que participasen en la polimerización de los alcoholes hidroxicinámicos es la de presentar una correlación cuantitativa con la lignificación. En el caso de las peroxidasas, esta correlación ha sido frecuentemente descrita en el endocarpo de melocotón (Abeles y Biles 1991), en fibras de lino (McDougall 1992), en álamo (Baier y cols. 1993), en agujas de picea noruega (Polle y cols. 1994) y en células en suspensión de *Zinnia* durante la diferenciación en traqueidas (Sato y cols. 1995a). Sin embargo, en ninguno de los casos anteriormente citados ha sido una sola peroxidasa, ya sea básica o ácida, la única implicada en esas correlaciones. De todos estos estudios se desprende la conclusión de que más de una isoenzima parece estar implicada en la polimerización de los alcoholes cinámicos. Estos estudios podrían explicar por qué la reducción en la expresión de una isoenzima de peroxidasa individual no está acompañada por una reducción en la lignificación de la pared celular.

Este hecho, más que una desventaja, podría ser una ventaja ya que la aparente redundancia en la función biológica mostrada por las isoenzimas de peroxidasa podría ser la causa de la heterogeneidad mostrada por las ligninas dentro de las diferentes áreas de la pared celular (Ros Barceló 1997).

Las distintas isoenzimas de peroxidasa pueden mostrar una cierta especificidad de sustrato y fuertes diferencias en su reactividad con los alcoholes hidroxicinámicos. Cuando se estudian las afinidades de varias peroxidasas básicas aisladas de tejidos lignificantes por los alcoholes cinámicos, se observan valores de k_M del orden de 10-400 μM (Takahama 1993, Ros Barceló

1998b). Estos valores de k_M mostrados por las peroxidasas son menores que los mostrados por las lacasas vegetales (12 mM) (Bao y cols. 1993), y se encuentran dentro del orden (5-500 μ M) de los valores de afinidad mostrados por las enzimas precedentes en la ruta biosintética (Grisebach 1981, Dharmawardhana y cols. 1995). En este punto, no se debe olvidar que los valores de k_M de las peroxidasas con respecto al alcohol coniferílico presentan una cierta dependencia de la concentración de H_2O_2 , siendo proporcionalmente menor al descender la concentración de H_2O_2 (Ros Barceló 1998b). De hecho, los valores de k_M mostrados para el H_2O_2 por muchas peroxidasas, cuando se usan concentraciones de alcohol coniferílico entre 30 y 160 μ M (Takahama 1993, Ros Barceló 1998b), sugieren que dichas enzimas se encuentran muy bien adaptadas a trabajar en presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 .

Debido a la necesidad que tienen las peroxidasas del H_2O_2 para su actuación, es lógico pensar que para que las peroxidasas tuvieran un papel activo en la lignificación de la pared celular, no sólo es indispensable que éstas se encuentren localizadas en las mismas áreas de la pared celular que lignifica, sino que también es necesario que, en ellas, las peroxidasas permanezcan activas (Figura 1.12). Por ello, es conveniente, aunque no indispensable (Ferrer y cols. 1990), que dichas áreas de la pared celular muestren una producción de H_2O_2 con el fin de favorecer la actividad de las peroxidasas.

El H_2O_2 necesario para la reacción es aportado por NADPH oxidasas (Ros Barceló y cols. 2002), amino oxidasas (Möller y McPherson 1998), oxalato oxidasas (Caliskan y Cuming 1998) e incluso en ciertas condiciones puede ser aportado por las propias peroxidasas, ya que presentan un ciclo oxidativo (Kawano 2003). El papel que desempeña el H_2O_2 como factor que controla la lignificación ha sido demostrado en varias ocasiones, ya que usando secuestradores de H_2O_2 se observa una reducción en la formación de lignina (Gabaldón y cols. 2005, Kärkönen y cols. 2002), el mismo fenómeno que cuando se bloquea la expresión de la superóxido dismutasa, que elimina el H_2O_2 . La acumulación de esta molécula en las paredes celulares está controlada por agentes reductores, siendo el más importante el ascorbato (Ros Barceló y cols. 2006). Se puede decir que el H_2O_2 desempeña un papel importantísimo en la lignificación, como se ha demostrado tanto en cultivos de elementos traqueales de *Zinnia elegans* como en la planta *in vivo* (Novo-Uzal y cols. 2013) La actuación de las peroxidasas en la pared celular está controlada por el

microambiente que se genera a su alrededor tanto de H_2O_2 como del aporte de monolignoles (Marjamaa y cols. 2009)

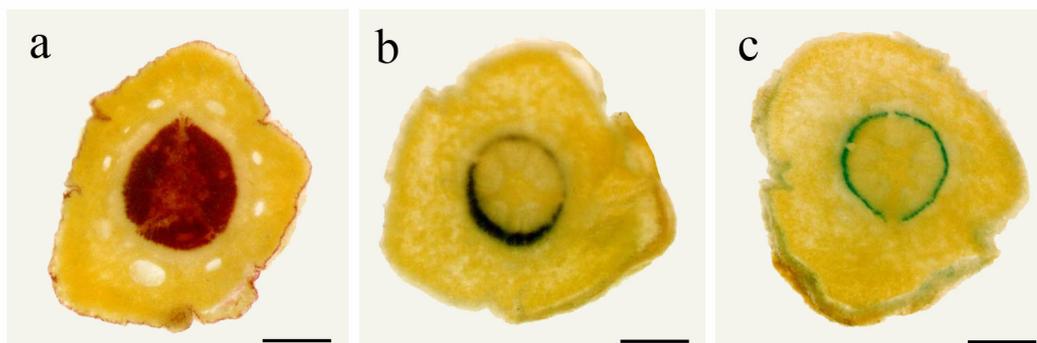


Figura 1.12. Secciones transversales de *Pinus halepensis* después de teñir con floroglucinol para revelar la presencia de ligninas (a), con KI-almidón para mostrar la localización del H_2O_2 (b), y TMB, que indica la colocalización de la peroxidasa y el H_2O_2 (c). Barras= 300 μ m. Tomado de Gómez Ros y cols. (2007).

III.4 La peroxidasa básica de *Zinnia elegans*

El último paso en la biosíntesis de ligninas está catalizado por peroxidasas y lacasas (Ros Barceló 1997, Berthet y cols. 2012). Las lacasas son capaces de catalizar la síntesis de unidades G, pero la formación de unidades S está restringida a las peroxidasas (Berthet y cols. 2012). Aunque numerosos estudios ponen de manifiesto el papel de las peroxidasas de clase III en la lignificación, sólo algunas isoenzimas están estrechamente relacionadas con esta función, como es el caso de la peroxidasa de *Z. elegans* (ZePrx) la cual está totalmente caracterizada y se sabe que es la responsable de la lignificación (Gabaldón y cols. 2005, 2006, Novo-Uzal y cols. 2013)

Los tallos y los hipocotilos de *Z. elegans* expresan la misma isoenzima básica de peroxidasa (López-Serrano y cols. 2004), la cual es capaz de oxidar tanto los alcoholes coniferílico y sinapílico como el coniferilaldehído y el sinapilaldehído. Además, la versatilidad de esta enzima es tal que la preferencia de sustrato cubre los tres *p*-hidroxibenzaldehídos y los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos (Ros Barceló y cols. 2003). Esta capacidad para la oxidación diferencial del alcohol sinapílico permitió definir un nuevo tipo de peroxidasas denominadas peroxidasas de tipo siringilo (Ros Barceló y cols. 2007)

La afinidad de esta peroxidasa de naturaleza fuertemente básica por los alcoholes *p*-hidroxicinámicos y sus correspondientes aldehídos es similar (Ros Barceló y Pomar 2001) a la mostrada por las enzimas precedentes de la ruta de

biosíntesis de las ligninas (F5H y CAD), que también usan los alcoholes *p*-hidroxicinámicos y sus correspondientes aldehídos como sustratos. Estos resultados indican que la ruta de biosíntesis de las ligninas no presenta sumideros metabólicos en los que los sustratos puedan acumularse, como se desprende de los flujos metabólicos en las células lignificantes (Anterola y cols. 2002).

Todo esto sugiere que esta peroxidasa juega un papel clave en la lignificación de la pared celular, lo cual está apoyado por su localización en el xilema (Ros Barceló y cols. 2000 y 2002, López-Serrano y cols. 2004). Existe un consenso general (Boerjan y cols. 2003) que las peroxidosas confieren una elevada plasticidad metabólica a la ruta biosintética de las ligninas, de hecho, la versatilidad (plasticidad metabólica) de esta peroxidasa básica confiere un cierto sentido a la heterogeneidad de la ruta de biosíntesis de las ligninas.

El hecho de que la proteína se exprese en hipocotilos, tallos y cultivos celulares de *Z. elegans* (Gabaldón y cols. 2005) sugiere que esta proteína no sólo cumple todos los requerimientos catalíticos para estar implicada en la lignificación superando todas las restricciones impuestas por el paso de polimerización, sino que también su expresión es inherente a la lignificación. La naturaleza de su pl básico no es algo excepcional, ya que las peroxidosas básicas se expresan diferencialmente durante la lignificación en otros sistemas modelo (Quiroga y cols. 2000, Holm y cols. 2003), mostrando propiedades bioquímicas inusuales y únicas como la oxidación de los residuos siringilo (Aoyama y cols. 2002). Además, el análisis de su promotor pone de manifiesto la existencia de elementos de respuesta para hormonas que están implicadas en la diferenciación del xilema como son auxinas, citoquininas, brasinoesteroides (Gutiérrez y cols. 2009), giberelinas (López Núñez-Flores y cols. 2010), además de otras moléculas como son NO y H₂O₂ (Gómez-Ros y cols. 2012). El promotor de ZePrx presenta elementos *cis* a los cuales pueden unirse determinados factores de transcripción, por tanto no sólo las hormonas regulan directamente la expresión de ZePrx sino que además hay factores de transcripción que están regulados por estas mismas hormonas y pueden interactuar con el promotor de ZePrx. Todo ello pone de manifiesto la implicación de esta peroxidasa en el proceso de lignificación.

III.5. Peroxidasas de tipo siringilo

El papel que desempeñan las peroxidasas en la polimerización de los alcoholes cinamílicos se ha descrito desde numerosas aproximaciones experimentales. Así, en tejidos lignificantes de tabaco (Lagrimini y cols. 1987), tomate (Mohan y cols. 1993) y de *Populus kitakamiensis* (Osakabe y cols. 1994) se expresan tanto los promotores del gen de la peroxidasa como una acumulación de sus transcritos.

Tanto las peroxidasas ácidas como las básicas son capaces de oxidar a los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico. Sin embargo, este hecho no está tan claro en el caso del alcohol sinapílico, que no es sustrato de muchas peroxidasas ácidas (Ros Barceló y cols. 1987; Dean y Eriksson 1994, Tsutsumi y cols. 1994, Takahama 1995, Bernards y cols. 1999), aunque existen excepciones (Christensen y cols. 1998, Quiroga y cols. 2000). Esta observación es importante para revelar la especificidad y naturaleza de la enzima implicada en la biosíntesis de lignina, puesto que el alcohol sinapílico es más proclive a la oxidación que el alcohol coniferílico y el *p*-cumarílico (Kobayashi y cols. 2005). Estos resultados sugieren que, aunque las reacciones catalizadas por la peroxidasa están conducidas por fuerzas termodinámicas redox (Ros Barceló y cols. 2004), la acomodación del sustrato en el centro catalítico de la enzima determina el papel real que juega cada isoenzima de la peroxidasa en la biosíntesis de ligninas. Así, se ha determinado, por estudios de cristalografía de rayos X, que la oxidación del alcohol sinapílico por ciertas peroxidasas ácidas está dificultada estéricamente debido a interacciones hidrofóbicas desfavorables entre los átomos metoxi del alcohol sinapílico y los residuos conservados I-138 y P-139 en el sitio de unión al sustrato de la enzima (Østergaard y cols. 2000).

Este solapamiento aparentemente no ocurre en el sitio de unión al sustrato de las peroxidasas ácidas que oxidan a la siringaldazina (Christensen y cols. 2001), y por supuesto, tampoco ocurre en la mayoría de las peroxidasas básicas, donde el residuo I-138 está sustituido por el residuo L-138. La capacidad de estas enzimas para oxidar residuos siringilo está universalmente aceptada (Tsutsumi y cols. 1994, Bernards y cols. 1999, Quiroga y cols. 2000, Ros Barceló y cols. 2000, Ros Barceló y Pomar 2001, Aoyama y cols. 2002), y explicaría por qué la supresión antisentido de las peroxidasas básicas en plantas transgénicas disminuye tanto los niveles de unidades G como de S (Blee y cols.

2003), mientras que la supresión antisentido de ciertas peroxidadas ácidas sólo produce la disminución de los niveles de unidades G (Li y cols. 2003).

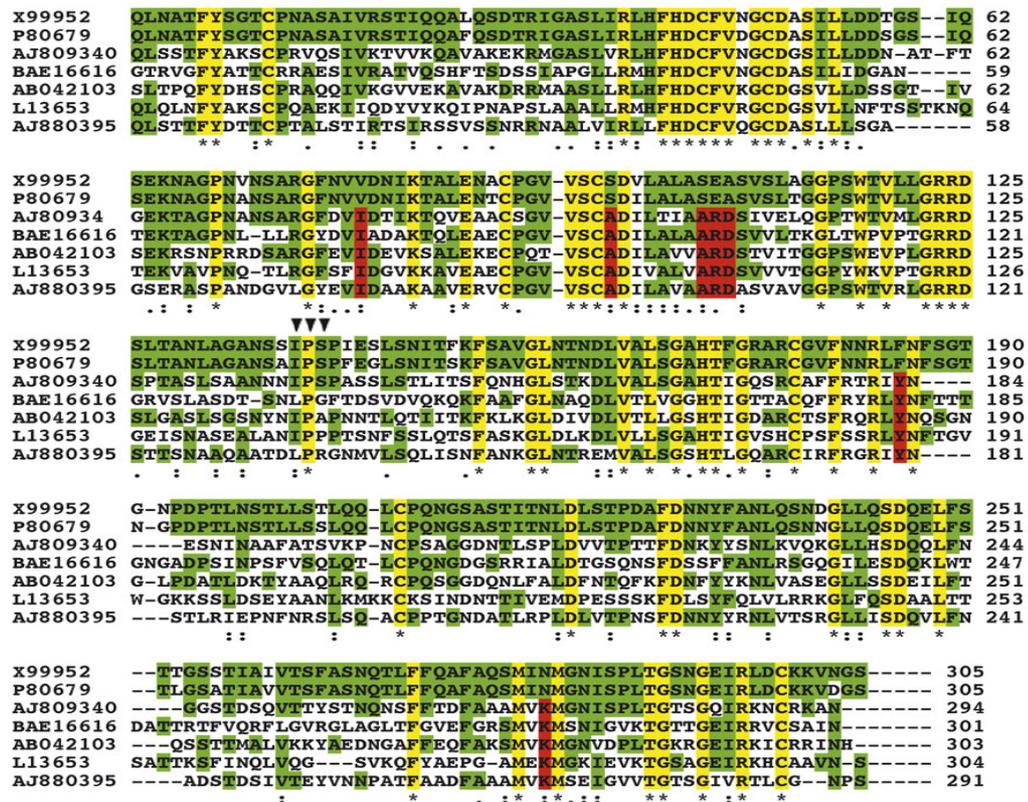


Figura 1.13. Alineamientos estructurales de peroxidadas tipo siringilo y guaiacilo. Los motivos estructurales de las peroxidadas S (en rojo) se determinaron alineando la peroxidada de *Z. elegans* (AJ880395) con las de tomate (L13653), espárrago (AB042103), álamo (BAE16616) y píceo (AJ809340) frente a dos peroxidadas G típicas, la ATP A2 (X99952) y HRP A2 (P80679). Los alineamientos muestran aminoácidos altamente conservados en todas las peroxidadas (en amarillo) y residuos aminoacídicos parcialmente conservados en ATP A2 y HRP A2 presentes en otras peroxidadas (en verde). Las puntas de flecha señalan los aminoácidos I138, P139 y S140 que determinan la conformación e hidrofobicidad del sitio de unión al sustrato en la ATP A2. “*” significa que los residuos aminoacídicos de la columna son idénticos en todas las secuencias del alineamiento. “:” significa que hay sustituciones conservadas. “.” significa que existen sustituciones semiconservadas. Tomado de Ros Barceló y cols. (2007).

Las peroxidadas de clase III con capacidad para oxidar el alcohol sináptico o su análogo químico siringaldazina han sido purificadas a partir de diferentes especies vegetales como *Lycopersicon esculentum* (Quiroga y cols. 2000), *Z. elegans* (Gabaldón y cols. 2005), *Betula pendula* (Marjamaa y cols. 2006) y *Populus alba* (Sasaki y cols. 2004). Ros Barceló y cols. (2007) describieron los determinantes estructurales de las peroxidadas de tipo siringilo alineando la secuencia aminoacídica de peroxidadas capaces de oxidar los residuos siringilo y de dos peroxidadas guaiacilo típicas ATP A2 y HRP A2. Los alineamientos revelaron motivos estructurales diferenciales (Figura 1.13), los cuales son necesarios y suficientes para determinar la actividad siringil-oxidasa

de las peroxididasas, como lo demuestra el hecho de que la peroxidida PAPX5 de *Picea abies*, que es capaz de oxidar la siringaldazina (Marjamaa y cols. 2006), muestra todos los motivos estructurales comunes a estas peroxididasas.

Comparando la estructura tridimensional de una peroxidida de tipo siringilo (*Z. elegans*) y otra de tipo guaiacilo (ATP A2 de *A. thaliana*) se encontraron diferencias que podrían explicar la diferente especificidad de sustrato (Figura 1.14). La hélice D' está ausente en las peroxididas de tipo siringilo estudiadas (Gómez Ros y cols. 2007). Esta observación puede constituir la piedra angular de la diferente especificidad de sustrato de las siringilperoxididasas, ya que en la ATP A2, la hélice D' fija la posición del grupo prostético (Østergaard y cols. 2000). La ausencia de la hélice D' en las siringilperoxididasas probablemente representa un factor de relajación del centro catalítico, permitiendo el acceso de grupos siringilo. Además, la hélice D' fija el motivo IPS en la ATP A2, que determina la conformación y la hidrofobicidad del sitio de unión al sustrato (Østergaard y cols. 2000).

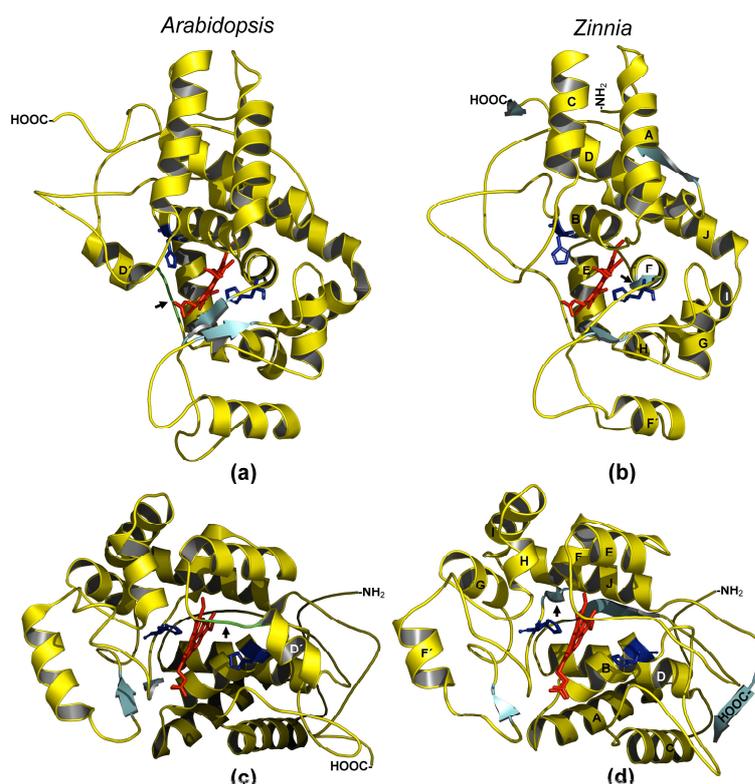


Figura 1.14. Estructura tridimensional de la ATP A2 (a) y (c) y de *Z. elegans* (b) y (d). Las hélices α están mostradas en amarillo. El motivo IPS aparece señalado en verde y con flechas en (a) y (c). Las láminas β aparecen en azul en (a) y (c) están ausentes en ZePrx, mientras que las nuevas láminas β que aparecen en (b) y (d) se muestran con flechas. El grupo hemo se muestran en color rojo, mientras que las histidinas proximal y distal aparecen en azul oscuro. Tomado de Ros Barceló y cols. (2007).

La láminas- β I, que aparece en la peroxidasa ATP A2 (en azul), está ausente en todas las siringil-peroxidasas, en las cuales surgen nuevas láminas- β (Gómez Ros y cols. 2007). Estas nuevas láminas- β se encuentran adyacentes a la histidina proximal, y deben influir en la conformación del centro catalítico. Todos estos factores probablemente condicionan la especificidad de sustrato de estas enzimas, determinando propiedades catalíticas únicas (Ros Barceló y cols. 2007).

En el caso de la peroxidasa CWPO-C de *Populus alba* los autores atribuyen su propiedad de oxidar el alcohol sinapílico a la presencia de dos residuos de tirosina (Tyr74 y Tyr177) (Shigeto y cols. 2012) cerca del grupo hemo. El residuo de Tyr74 está presente también en la peroxidasas de *Zinnia elegans*, por tanto esta podría ser otra posible explicación de la capacidad de ciertas peroxidasas para oxidar el alcohol sinapílico (Shigeto y cols. 2013)

III.6 Peroxidasas de *Arabidopsis*

En *A. thaliana* se han identificado 73 genes que codifican para peroxidasas de clase III (Tognolli y cols. 2002, Welinder y cols. 2002). Mediante análisis de microarrays se asignó una función determinada a 36 de estas peroxidasas, mientras que por técnicas proteómicas y aproximaciones transgénicas se asignó función a 12 y 9 genes de peroxidasas, respectivamente. Un total de 44 genes de los 73 que codifican para peroxidasas de clase III posiblemente estén implicados en mecanismos específicos. La mayoría de estas peroxidasas están relacionadas con mecanismos de defensa y fenómenos de respuesta a diferentes tipos de estreses: metales (Kumari y cols. 2008), patógenos (Mohr y Cahill. 2007), ozono (Miyazaki y cols. 2004), frío (Llorente y cols. 2002), anoxia (Klok y cols. 2002), déficit de potasio (Kang y cols. 2004); mientras que otras están involucradas en procesos de desarrollo (Irshad y cols. 2008) y formación de la pared celular (Yokoyama y Nishitani 2006).

Las funciones asignadas a estas peroxidasas se han hecho en base a datos obtenidos a partir de microarrays y únicamente seis de las 44 peroxidasas con función asignada se han analizado mediante PCR cuantitativa (Kumari y cols. 2008). Los microarrays se basan en el estudio de perfiles transcriptómicos y esto puede llevar a error, ya que la presencia de un cierto transcrito no tiene por

qué estar relacionada necesariamente con la presencia de la proteína para la cual codifica (Dunand y cols. 2003). Los estudios de proteómica trabajan directamente con la proteína pero también pueden dar lugar a una gran cantidad de falsos positivos.

Con el fin de identificar las funciones de las peroxidasas de clase III, actualmente se están empleando plantas transgénicas para los diferentes genes objeto de estudio. En el caso de la identificación de peroxidasas implicadas en la lignificación los investigadores buscan homologías con otras peroxidasas cuyo papel en la lignificación está claramente definido. Una vez identificados los candidatos mediante el uso de mutantes comerciales o bien transformantes obtenidos en el laboratorio se intenta determinar el papel de esa peroxidasa en la lignificación, mediante sobreexpresión o bloqueo de la misma. De esta manera han sido identificadas peroxidasas implicadas en la rigidez de la pared por su participación en la polimerización de la lignina: AtPrx64 (Lee y cols. 2013), AtPrx2, AtPrx25 y AtPrx71 (Shigeto y cols. 2013), AtPrx67 (Pedreira y cols. 2011), AtPrx72 y peroxidasas implicadas en la ruptura de uniones entre polisacáridos de la pared haciendo que ésta sea más laxa: AtPrx36 (Kunieda y cols. 2013), AtPrx33/34 (Passardi y cols. 2006) y AtPrx53 (Jin y cols. 2011). A pesar de todo, a veces ocurre que la alteración de una peroxidasa homóloga a otra implicada en la lignificación no tiene ningún efecto sobre la planta lo que podría deberse a dos motivos: I) la presencia de peroxidasas redundantes y II) la escasa especificidad de sustrato que presentan.

III.7. Peroxidasas siringilo en *A. thaliana*

En los últimos diez años sólo se han identificado tres peroxidasas que muestran una preferencia de sustrato hacia el alcohol sinapílico en vez de hacia el coniferílico, ZePrx de *Z. elegans* (Gabaldón y cols. 2005), BPX1 de *Betula pendula* (Marjamaa y cols. 2006) y CWPO-C de *Populus alba* (Aoyama y cols. 2002). El papel de la peroxidasa básica de *Z. elegans* en la lignificación ha sido ampliamente demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Novo-Uzal y cols. 2013), por tanto cabe esperar que algunas de las 73 peroxidasas de *Arabidopsis* estén implicadas en la lignificación y además sean de tipo siringilo, teniendo en cuenta que las ligninas del tallo de *Arabidopsis* están constituidas por un 35% de unidades S (Rogers y cols. 2005).

Shigeto y cols. (2013) encontraron en *Arabidopsis* tres peroxidasas de clase III (AtPrx2, AtPrx25 y AtPrx71) homólogas en secuencia con CWPO-C. Mutantes *knock-out* para estas enzimas demostraron tener una menor cantidad de lignina, aunque en cambio el ratio S/G era mayor en los mutantes, lo cual sugiere que las tres peroxidasas seleccionadas no son peroxidasas de tipo siringilo. Sin embargo estos autores generaron proteínas recombinantes de estas peroxidasas y demostraron *in vitro* que las proteínas recombinantes presentaban mayor actividad catalítica frente a siringaldazina (Shigeto y cols. 2014). Estos resultados demuestran que la actividad catalítica de las enzimas *in vitro* y su papel *in vivo* puede diferir, lo que hace imprescindible caracterizar funcionalmente dichas proteínas en la planta.

Utilizando la peroxidasa de *Zinnia* como modelo de peroxidasa siringilo y atendiendo a la estructura primaria, secundaria, terciaria, carga superficial de la proteína y estabilidad del RNAm, Herrero y cols. (2013b) realizaron una búsqueda bioinformática para localizar qué peroxidasas de *A. thaliana* podrían ser candidatas a peroxidasas siringilo implicadas en la lignificación. Atendiendo a su estructura primaria un total de 10 peroxidasas fueron seleccionadas, aquellas con un E-valor más bajo (tabla 1). AtPrx53 (también denominada ATP A2) fue descartada inicialmente ya que ha sido ampliamente caracterizada y estudiada y, como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que su comportamiento y propiedades difieren de ZePrx (Nilsen y cols. 2001). Las 10 peroxidasas seleccionadas presentaban los elementos estructurales característicos de las peroxidasas de tipo siringilo (Ros Barceló y cols. 2007). Atendiendo a su carga de superficie AtPrx14 y AtPrx36 fueron descartadas por presentar diferencias con las de *Zinnia*: AtPrx36 presenta una carga superficial negativa, lo cual hace que su ubicación e interacción con componentes de la pared celular sea muy diferente a la de *Zinnia*, siendo este un factor determinante para descartarlas como peroxidasas involucradas en el último paso de la biosíntesis de ligninas (Herrero y cols. 2013b)

Tabla I. Peroxidasas de *A. thaliana* con mayor homología a la de *Z. elegans* (ZePrx), en función de su E-Valor

Nombre	Código TAIR	pI	E-
AtPrx4	NP_172906.1	7.68	1e-
AtPrx5	NP_172907.1	8.73	1e-
AtPrx52	NP_196153.1	8.20	2e-
AtPrx68	NP_200648.1	9.76	1e-
AtPrx67	NP_2020647.1	10.40	1e-
AtPrx36	NP_190668.2	4.52	8e-
AtPrx14	NP_179406.1	6.29	4e-
AtPrx49	NP_195361.1	8.56	4e-
AtPrx53	NP_196290.1	4.61	7e-
AtPrx72	NP_201440.1	8.54	9e-

Atendiendo a la estabilidad de los RNAm la peroxidasa 5 fue descartada, ya que además de no tener UTRs, lo cual dificultaría su traducción, presenta un elemento DST (downstream sequence) y un elemento ARES (*AU*-rich regions), los cuales confieren una vida media corta al RNA, por lo que el transcrito de esta peroxidasa es altamente inestable. Por el contrario, los transcritos de AtPrx4 y AtPrx52 son muy estables (Herrero y cols. 2013b).

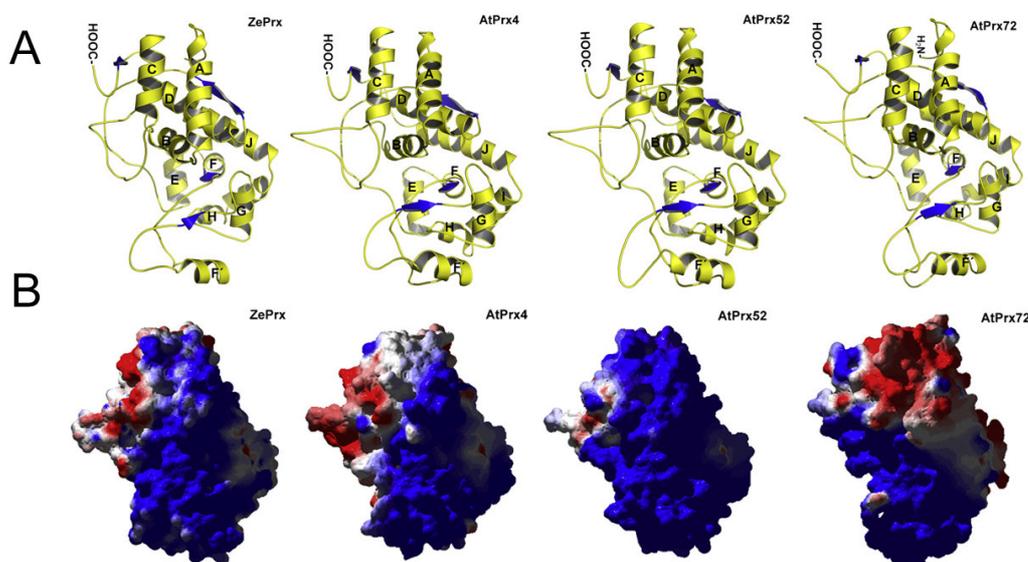


Figura 1.15. Comparación de la estructura tridimensional (a) y de la carga superficial (b) de las peroxidasas de *A. thaliana* con mayor homología a ZePrx. Todas estas peroxidasas carecen de la hélice D' al igual que ZePrx, lo que les permite oxidar el alcohol sináptico. Además todas presentan una superficie cargada positivamente al igual que ZePrx. Modificado de Hererro y cols. (2013b).

En el intento de seguir refinando la búsqueda de peroxidasas de tipo siringilo se realizó un análisis de los promotores de estas peroxidasas en busca

de elementos de respuesta a hormonas, NO y H₂O₂ (Herrero y cols. 2014). Según los resultados de estos autores, AtPrx49 se descartó como homóloga a ZePrx, ya que no presenta elementos de repuesta a brasinoesteroides. Además, esta peroxidasa, junto con AtPrx67, muestran una ausencia importante de elementos *cis* de respuesta a NO y H₂O₂, característica que no comparten con ZePrx (Herrero y cols. 2014).

Atendiendo a la búsqueda de peroxidasas de tipo siringilo en *A. thaliana* realizada por Herrero y cols. (2013b, 2014) tres son las elegidas como posibles candidatas, AtPrx4, AtPrx52 y AtPrx72. De entre estas tres cabe destacar que la peroxidasa con mayor homología a la de *Zinnia* es AtPrx52: su promotor puede ser diana para varias hormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas y brasinoesteroides), moléculas señal (NO y H₂O₂) y para un conjunto de factores de transcripción que están regulados por hormonas que participan durante el crecimiento secundario.

Objetivos

A la vista de los antecedentes descritos en la Introducción, los objetivos de la presente memoria son:

1. Selección de mutantes *knockout* para las peroxidasas 4, 52 y 72 de *Arabidopsis*, que muestran una mayor homología con la peroxidasa de *Zinnia elegans*; así como la obtención de individuos 100% homocigóticos para dichos genes.
2. Caracterización biométrica de los mutantes de peroxidasas de *Arabidopsis* frente a la variedad silvestre.
3. Estudio del efecto del fotoperiodo en la fisiología de los mutantes *knockout* de la peroxidasa 4 de *Arabidopsis*.
4. Estudio del efecto de las mutaciones sobre el desarrollo, estructura y organización vasculares, así como sobre la composición de las paredes celulares del tallo de la inflorescencia de *Arabidopsis*.
5. Análisis cualitativo y cuantitativo del efecto de la mutación sobre la naturaleza de las ligninas del tallo de la inflorescencia.
6. Estudio del efecto de la supresión de los genes de peroxidasas en la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de ligninas, así como de los factores de transcripción que regulan dicha ruta.
7. Análisis de la expresión de genes que participan en la síntesis de otros componentes de la pared celular y de otras rutas metabólicas relacionadas con el suministro de esqueletos carbonados para la biosíntesis de ligninas.

Materiales y métodos

I. Material vegetal

Las semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia 0 (WT) y las de los mutantes *atprx4* (Salk_044730.56.00.X), *atprx52* (Salk_081257.50.70.x y SM_3_1699) y *atprx72* (Salk_136893.44.70.x y Sail_891_H09) se obtuvieron del catalogo *on-line* del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) en [http://nasc.nott.ac.uk / home.html](http://nasc.nott.ac.uk/home.html). Las líneas mutantes contienen una inserción en el gen de la peroxidasa seleccionada, que impide su expresión y por lo tanto, una pérdida de función en esa proteína (Figura 2.1). Para facilitar la selección de los mutantes, estas líneas poseen un marcador de resistencia al antibiotico kanamicina, (líneas Sail_891_H09 y SM_3_1699) o resistencia a glufosinato amónico (líneas Salk_044730.56.00.X, Salk_081257.50.70.x y Salk_136893.44.70.x) (Alonso y cols. 2003).

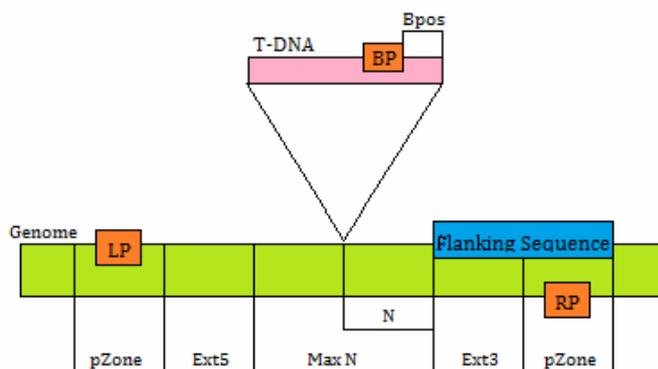


Figura 2.1. Esquema de la localización de los cebadores para la identificación de los mutantes homocigóticos. Tomado del Salk Institute Genome Analysis Laboratory

II. Selección de mutantes

Las semillas de los mutantes se esterilizaron superficialmente por inmersión en etanol al 70 % (v/v) durante 20 s, seguido de una inmersión en una solución de hipoclorito sódico al 10 % (v/v) durante 10 min en agitación. Transcurrido este tiempo, las semillas se lavaron 4 veces con agua destilada estéril y se mantuvieron en condiciones de frío (4°C) durante 3 días para su estratificación (Harrison y cols. 2006).



Figura 2.2. Selección de mutantes *knock-out* crecidos en medios MS suplementado con kanamicina

Transcurrido el tiempo de estratificación, la mitad de las semillas tanto del WT como de los mutantes se sembraron en medio MS sólido (4.33 g l⁻¹ sales MS, 0.5 % de sacarosa y 0.8% Bactoagar a pH 5.7 ajustado con 1 M KOH; Murashige y Skoog, 1962), y la otra mitad en medio MS sólido suplementado con 20 µg ml⁻¹ de kanamicina (Figura 2.2) o 10 µg ml⁻¹ de glufosinato amónico como agentes de selección.

Las placas se mantuvieron en condiciones controladas día/noche de 22 °C/20 °C, humedad relativa del 70 % y bajo un fotoperiodo de 16 h de luz (110 µmol m⁻² s⁻¹) y 8 h de oscuridad, en una cámara de crecimiento (Conviron CMP6050). Transcurridas dos semanas aquellas plantas capaces de crecer en el medio de selección se transfirieron a maceteros (Teku) de 70 ml de capacidad con sustrato de cultivo (Profi- Substrate, que contiene un 34 % de C orgánico, un 0.2 % de N orgánico y un 68 % de materia orgánica total, estando el pH comprendido entre 5.0 y 6.5, los niveles de fertilizantes eran 50-300 mg L⁻¹ de N, 80-300 mg L⁻¹ de P₂P₅ y 80-400 mg L⁻¹ de K₂O), conteniendo vermiculita en una proporción 3:1 y regándose una vez a la semana a capacidad de campo.

III. Aislamiento de DNA

Transcurridas cuatro semanas después de transferir a tierra las plantas capaces de crecer en medio selectivo, se realizó el aislamiento del DNA

(Edwards y cols. 1991) para confirmar la presencia de la inserción dentro del gen de las diferentes peroxidadasas seleccionadas.

El aislamiento del DNA genómico se realizó a partir de discos de hoja. Para ello los discos se homogeneizaron en un tubo tipo eppendorf con ayuda de un pistilo, en 400 μ l de un tampón de extracción compuesto por: Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS al 0.5 %. El homogenado se centrifugó a 15700xg durante 5 min, 350 μ l del sobrenadante obtenido se mezcló con 1 ml de isopropanol frío y se incubó durante 10 min en hielo. A continuación, las muestras se centrifugaron a 15700xg durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado resultante se lavó con 1 ml de acetato sódico 0.2 M en etanol al 76 %. Tras una nueva centrifugación a 15700xg durante 5 min, el precipitado resultante se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó en las mismas condiciones. El precipitado final se secó en la estufa durante 10 min a 37 $^{\circ}$ C, y posteriormente, se resuspendió en 80 μ l de agua MiliQ estéril. La detección de las plantas mutantes homocigóticas se llevó a cabo mediante una amplificación por PCR (94 $^{\circ}$ C 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s y 72 $^{\circ}$ C durante 1 min, finalizando con 72 $^{\circ}$ C durante 5 min) del DNA extraído anteriormente. El diseño de los cebadores se realizó mediante la herramienta de diseño del SIGnAL (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>) (Ostergaard y Yanofsky, 2004). Los productos de PCR se corrieron en un gel del agarosa al 1% confirmando que el tamaño de las bandas era el esperado para los mutantes homocigóticos (Figura 2.3).

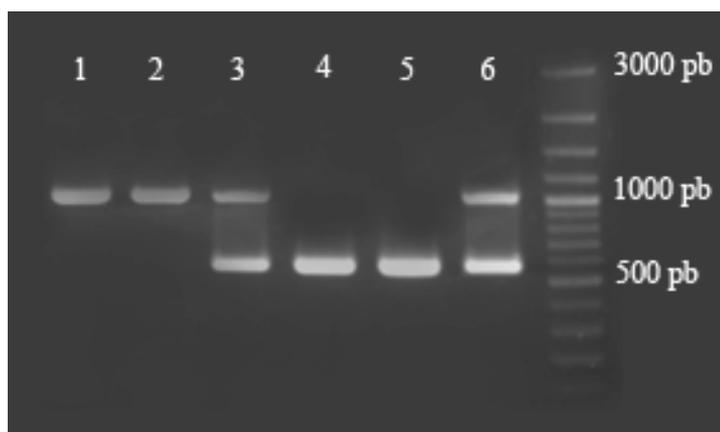


Figura 2.3. Identificación mediante PCR de plantas homocigóticas para el gen *AtPrx4*. Así, mientras los individuos 1, 2, son WT, los individuos 4 y 5 son homocigóticos y los individuos 3 y 6 son heterocigóticos para la mutación

IV. Condiciones de crecimiento

Una vez seleccionadas, tanto por selección en medio de cultivo como por PCR, aquellas plantas homocigóticas para la mutación se dejaron crecer y se recolectaron sus semillas, las cuales se esterilizaron y estratificaron según el método descrito anteriormente en el apartado II. Estas semillas procedentes de plantas homocigóticas, se germinaron directamente en sustrato, manteniéndolas cubiertas con film durante 5 días para conseguir una germinación próxima al 100 %.

Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento en las condiciones descritas anteriormente. Para el estudio del efecto de la luz sobre las plantas mutantes, se utilizaron los siguientes fotoperiodos:

- Fotoperíodo de día largo (FDL): 16/8 h luz/ oscuridad.
- Fotoperíodo de día corto (FDC): 8/16h luz/ oscuridad.

V. Análisis fenotípico

El análisis fenotípico de las plantas se realizó según describe Boyes y cols. (2001). Para ello se utilizaron bandejas con 50 plantas, tanto de WT como de los diferentes mutantes y se calcularon los siguientes parámetros:

a) Área foliar de la roseta. Se tomaron medidas a partir de la etapa de desarrollo 1.04 (Boyes y cols. 2001). Las plantas se fotografiaron y las fotos se analizaron utilizando el software ImageJ 1.46 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

b) Radio mayor de la roseta. Este parámetro se midió con el mismo procedimiento que el área foliar.

c) Longitud del tallo principal de la inflorescencia. Este parámetro se midió en un estado de desarrollo posterior que se corresponde con la etapa 5 descrita por Boyes y cols. (2001).

En todos los casos las medidas se tomaron cada 2 o 3 días, en las 50 plantas de cada tipo. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el test de Student.

VI. Ensayos histoquímicos para la detección de ligninas

Las ligninas se detectaron en secciones de tallo de la inflorescencia utilizando las tinciones de Mäule y Wiesner además, se empleó la tinción con azul de toluidina que tiñe las paredes celulares. Para ello, se utilizaron plantas recolectadas en la etapa de desarrollo 6.3 (Boyes y cols. 2001), correspondiente a plantas con una altura de 15 cm. Las secciones transversales se realizaron utilizando los primeros 5 cm de la parte basal de los tallos. Todas las imágenes adquiridas en los distintos tipos de microscopios se procesaron mediante Adobe PhotoShop CS®.

VI.1. Tinción con azul de Toluidina

Las secciones se fijaron en solución Mc Dowell (Mcdowell y Trump, 1976), se lavaron con tampón cacodilato sódico 0.1 M en sacarosa y se trataron con OsO₄ al 1% a 4°C. Seguidamente, se lavaron en el mismo tampón, se deshidrataron con series graduales de alcohol y se embebieron en resina Spurr (Spurr, 1969). Una vez incluidas en la resina, las secciones se cortaron con un Ultramicrotomo Leica UC6 en secciones semifinas de 5 µm, se tiñeron con azul de toluidina (entre 0.5-1 %) (Ros Barceló y cols. 1991) y se observaron en un microscopio confocal NIKON Eclipse 90i. Las fotografías se realizaron con una cámara DXM 1200C.

VI.2. Tinciones de Mäule y de Wiesner

Paras realizar estas tinciones, primeramente las secciones hechas a mano se fijaron en FAA (formaldehído 3.7%, alcohol 47.5% y ácido acético 5%) durante una hora.

Tinción de Wiesner

Esta tinción detecta específicamente los grupos cinamaldehído de las ligninas (Pomar y cols. 2002). Para realizar esta tinción, las secciones de los tallos se incubaron con una solución que contenía floroglucinol (1, 3, 5-trihidroxibenceno) al 1% (p/v) en HCl/EtOH (25:75) (v/v) durante 10-15 min. Las

observaciones y fotografías se realizaron en un microscopio confocal NIKON Eclipse 90i y con una cámara DXM 1200C.

Tinción de Mäule

Esta tinción, específica para los grupos S de las ligninas, se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Atanassova y cols. (1995), incubando las secciones en KMnO_4 al 1% en agua, durante 5 min. A continuación, se realizó un lavado y se destiñeron con HCl al 10% durante 5 min, después las secciones se lavaron con agua, y se introdujeron en amoníaco concentrado (Pomar y cols. 2002) para posteriormente ser incluidas en una solución de glicerol al 35 %. Las observaciones y fotografías se realizaron con el mismo microscopio y cámara utilizados para la tinción de Wiesner.

VII. Microscopía electrónica de transmisión

Para la observación de las muestras en el microscopio electrónico de transmisión se realizó el mismo procedimiento descrito para las tinciones con azul de toluidina, pero en este caso las secciones realizadas fueron de $0.5 \mu\text{m}$ de espesor y posteriormente fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo durante 15 min (Reynolds, 1961). Las secciones se observaron con un microscopio electrónico PHILIPS TECNAI 12 trabajando a 60 kV.

VIII. Microscopía electrónica de barrido

Secciones realizadas a mano se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato sódico 0.1M durante 4 h. Después estas secciones se lavaron toda la noche en el mismo tampón pero sin glutaraldehído y con sacarosa, para después postfijarlas en tetraóxido de osmio al 1% durante 2 h. Más tarde se lavaron durante toda la noche con tampón cacodilato más sacarosa 0.1 M y se sometieron a una deshidratación en un gradiente de concentraciones crecientes de acetona. Una vez deshidratadas se les realizó el punto crítico a las muestras con CO_2 líquido en 100% de acetona, para más tarde recubrir las de oro en un metalizador Biorad-Polaron division (200A). Las muestras se observaron con un microscopio electrónico de barrido Jeal 6.100, usando el sistema de captación de imagen Autobeam del sistema de microanálisis INCA X-Stream and Mics de OXFORD instrument analytical.

IX. Análisis de las paredes celulares

IX 1. Obtención de las paredes celulares

Para realizar los análisis de las ligninas se utilizó el tallo de la inflorescencia, que se recogió cuando la planta se encontraba en la etapa 8 de desarrollo (Boyes y cols. 2001). Para el aislamiento de las paredes celulares se siguió el método descrito por Pomar y cols. (2002). El material vegetal se homogenizó con nitrógeno líquido y se centrifugó a 1000xg durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó 2 veces con Triton X-100 al 1% en las mismas condiciones. El precipitado se volvió a lavar con agua 4 veces. Se hicieron lavados con etanol absoluto, unas 3-4 veces en idénticas condiciones, hasta que el sobrenadante quedó transparente. Para secar las paredes, el precipitado se filtró sobre un filtro de celulosa y con vacío, lavándolo 2 veces con etanol al 96% y con éter dietílico. El material seco se consideró la fracción de las paredes celulares.

IX.2. Cuantificación de ligninas con bromuro de acetilo

Para la cuantificación de ligninas se siguió el procedimiento descrito por Iiyama y Wallis (1988). Se pesaron 5 mg de paredes celulares, se les añadió bromuro de acetilo al 25% (p/p) en ácido acético en un volumen de 500 μ l. Esta mezcla se incubó a 70 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar, se añadió 1 ml de NaOH 2N y finalmente, se enrasó a 10 ml con ácido acético. Tras dejar reposar las muestras, se midió la absorbancia a 290 nm. Para calcular la concentración de ligninas se usó un factor de absorptividad de 20,091 g⁻¹cm⁻¹ según la estimación de Iiyama y Wallis (1988).

IX. 3. Análisis mediante espectroscopía de infrarrojos (FTIR)

Las paredes celulares se pulverizaron en un mortero hasta conseguir un polvo muy fino. Los espectros se realizaron usando un espectrómetro Bruker Vector 22 FTIR (Bruker Optics, Madrid, España), equipado con un ATR de reflexión simple con prisma de diamante Golden Gate (Specac), cuyo brazo permitió aplicar una presión constante a la muestra sobre el cristal, para conseguir un contacto perfecto entre la muestra y el haz de infrarrojos incidente, evitando la pérdida de radiación incidente.

Se obtuvieron 30 espectros de infrarrojo entre 300 y 4000 cm^{-1} para cada réplica, con una resolución de 4 cm^{-1} . Los datos obtenidos de los espectros de FTIR se analizaron con el programa OPUS 5.5 de Bruker para su normalización y corrección de la línea base.

IX.4. Oxidación de las paredes celulares con nitrobenceno

La oxidación alcalina con nitrobenceno de las paredes celulares y los análisis de HPLC de los productos obtenidos se llevaron a cabo según Pomar y cols. (2002). Para la reacción, 25 mg de paredes celulares se incubaron durante 150 min a 170 °C en una mezcla de 2.5 ml de NaOH 2N y 0.25 ml de nitrobenceno, usando para ello tubos pyrex de tapón con teflón que se agitaron suavemente cada cierto tiempo. Al terminar el periodo de incubación los tubos se enfriaron y a cada uno se le añadió 2.5 ml de agua destilada, extrayéndose en un embudo de decantación con 2.5 ml de diclorometano (CH_2Cl_2). Esta extracción se realizó tres veces únicamente añadiendo 2.5 ml de diclorometano, con el fin de eliminar los productos de degradación del nitrobenceno. El residuo acuoso de las tres extracciones se acidificó entonces a un pH entre 1.0 y 2.0 con HCl 5N. Una vez ajustado el pH se extrajo en un embudo de decantación con 5 ml de diclorometano-acetato de etilo (1:1) reteniendo la fase orgánica, repitiendo esta extracción tres veces. El conjunto de extracciones se juntó en un único volumen, se le añadió Na_2SO_4 en exceso, y tras haberlo filtrado se evaporó a sequedad en un rotavapor (Buchi R-200). El residuo final se disolvió en metanol, se pasó a través de un filtro de tamaño de poro de 0.45 μm ajustándose el volumen final de nuevo a 1 ml de metanol.

Las muestras se analizaron por cromatografía líquida (HPLC) en una columna de fase reversa Spherisorb ODS2 C18 usando un equipo Waters Alliance, equipado con un detector de diodos Waters 996. Para llevar a cabo la cromatografía se utilizaron las mezclas de solventes A, que contenía acetonitrilo al 50% y ácido acético al 2% y B, que se trataba de ácido acético al 2%. El programa usado consistió en un gradiente de: 35% solvente A, 65% solvente B minuto 0; 40% solvente A, 60% solvente B minuto 5; 50% solvente A, 50% solvente B minuto 14 y 35% solvente A, 65% solvente B minuto 16. La cuantificación del *p*-hidroxibenzaldehído, la vanillina y el siringaldehído se realizó a 290 nm usando los correspondientes estándares comerciales.

IX.5. Análisis cualitativo mediante tioacidolisis

La técnica empleada para la realización de la tioacidolisis fue la descrita por Lapierre y cols. (1995). Para llevar a cabo la reacción, se pesaron 15 mg de las paredes celulares y se mezclaron con 10 ml de una disolución de BF₃ eterato 0.2 M en una mezcla 8.75/1 (v/v) dioxano/etanotiol. La tioacidolisis se realizó en tubos de vidrio pyrex sellados con tapón con teflón en un termobloque a 100 °C durante 4 h, agitando suavemente cada cierto tiempo.

Una vez transcurridas 4 h, se añadieron 30 ml de agua con el fin de detener la reacción y enfriar la mezcla. Seguidamente, se ajustó el pH a un valor entre 3.0 y 4.0 con una solución 0.4 M de Na₂CO₃. Una vez ajustado el pH, se procedió a la extracción con 30 ml de diclorometano, usando para ello un embudo de decantación. Esta extracción se realizó 3 veces, tras lo cual los volúmenes obtenidos se mezclaron, añadiéndose Na₂SO₄ en exceso para eliminar el agua arrastrada. A continuación, se procedió a la evaporación del diclorometano hasta sequedad en un evaporador rotatorio (Buchi R-200) a 40 °C. El residuo final se disolvió en 100 µl de BSTFA (N,O bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) y 10 µl de piridina y los trimetil-silil derivados se analizaron en un equipo de GC-MS (Thermo Finnigan).

Análisis de los trimetil-silil derivados en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

Para el análisis de las muestras anteriormente obtenidas, se utilizó un cromatógrafo Thermo Finnigan Trace GC, equipado con una columna DB-XLB, J&W, de 60 m x 0.25 mm de diámetro interno, usando helio como gas portador a un flujo constante de 1 ml min⁻¹. El programa de temperatura fue desde 90 °C hasta 270 °C, a una velocidad de 5 °C min⁻¹. El cromatógrafo se acopló a un detector de masas Thermo Finnigan Polaris Q, que trabajó con una intensidad de impacto electrónico de 70 eV.

IX. 6. Análisis de hidratos de carbono

Para la determinación del contenido e identificación de hidratos de carbono presentes en la pared celular, 20 mg de paredes se incubaron con H₂SO₄ (72%) a una temperatura de 25 °C durante 120 min en agitación.

Transcurridas las dos horas la mezcla se diluyó con agua hasta alcanzar una concentración de H₂SO₄ del 4 %. Esta nueva solución se autoclavó a 120 °C durante 120 min. Las muestras se filtraron, el residuo seco se pesó para determinar la cantidad de lignina, el sobrenadante se neutralizó con Na₂B₄O₄ y se filtró a través de una membrana de nylon de 0.22 µm de tamaño de poro.

Los monosacáridos se analizaron utilizando un HPLC (Waters 1500 Series) con una columna Biorad Aminex HPX-87P termostaticada a una temperatura de 85 °C. Los monosacáridos glucosa, xilosa, manosa, galactosa, arabinosa y ácido acético (derivado de los grupos acetato de las hemicelulosas) se detectaron por su índice de refracción, mediante un detector de refracción a una temperatura de 30 °C. El hidroximetilfurfural (derivado de las hexosas) y el furfural (derivado de las pentosas) se detectaron con un diodo array a una longitud de onda de 254 nm. El gradiente empleado para la separación de todos los compuestos fue isocrático con H₂SO₄ (4mM), a un flujo de 0.6 ml min⁻¹ (Ferrer y cols. 2011).

X. Análisis de la expresión génica

X.1. Aislamiento y purificación de RNA

El RNA total se aisló a partir de diferentes partes de Arabidopsis (100 mg de tejido pulverizado con nitrógeno líquido) utilizando Trizol (Chomczynski 1993) y siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial (Invitrogen). Para que el análisis de la expresión génica sea correcto, la muestra de RNA tiene que estar libre de restos de DNA genómico, puesto que su presencia implicaría la aparición de falsos positivos o de resultados erróneos, por ello el RNA se trató con DNasa para eliminar los posibles restos de DNA y se purificó utilizando el kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Debido a la inestabilidad del RNA y su facilidad para degradarse se trabajó a 4°C y se utilizó material libre de RNAsas (doblemente autoclavado).

X.2. Cuantificación del RNA total

El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, USA). Además, se comprobó la integridad del RNA mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %.

X.3. Síntesis de DNAc

Se utilizó 1 µg de RNA total para la síntesis de cDNA, a través de una reacción de retrotranscripción utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo scientific), siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez terminada la reacción de síntesis el DNAc se guardó a -80°C hasta el momento de su utilización.

X.4. PCR cuantitativa a tiempo real

El estudio de la expresión diferencial de los genes que codifican para las enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de las ligninas, así como para factores de transcripción implicados en la síntesis de la pared celular y genes de otras rutas del metabolismo fenilpropanoide, se realizó con ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real empleando el equipo 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para la reacción de PCR a tiempo real se utilizó el SYBR Green PCR Core Reagents (Life Technologies). La mezcla de reacción final contenía: 7.5 µL de SYBR Green PCR Mastermix, 0.1 µM de cebador (anexo 1), 3.75 µL de una dilución de DNAc 1:100 y 3.45 µL de agua. Las reacciones se prepararon en una placa de 96 pocillos (Applied Biosystems). Todas las muestras se analizaron por triplicado. Para ello, después de una activación inicial de la polimerasa a 95 °C durante 10 min, las muestras se sometieron a 40 ciclos de amplificación cada uno comprendido por: 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min y finalmente 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min y 95 °C durante 15 s. La especificidad de los amplicones se comprobó a partir del análisis de las curvas de disociación. Los datos fueron analizados con el software Applied 7500 System SDS 2.0.5. La eficacia de los cebadores se calculó y los valores de Ct se procesaron siguiendo el método descrito por Pfaffl (2001), normalizando los resultados con respecto al gen de la actina, cuya expresión es constante. Según este método, la expresión relativa se define como:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{E^{\Delta C_t \text{ gen (Ct Wt - Ct mutante)}}}{E^{\Delta C_t \text{ actina (Ct Wt - Ct mutante)}}$$

Donde E es la eficiencia y Ct es el número de ciclos a los que se detecta la señal. La referencia en nuestro caso fue la actina.

Resultados y discusión

**I. EFECTO DEL BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE *ATPRX4* EN PLANTAS
DE *A. THALIANA***

I.1. Localización de la inserción de T-DNA en el gen *AtPrx4* y de su expresión en diferentes órganos de *A. thaliana*

El gen que codifica para la peroxidasa 4 de *Arabidopsis* (*At1g4540*) está localizado en el cromosoma 1 y tiene la estructura clásica de cuatro exones y tres intrones que se suele encontrar en los genes de peroxidasas. Para la realización de los análisis se seleccionó una línea mutante *atprx4* (SALK_044730.56.00) con una inserción de T-DNA en el exón 4 del gen (Figura 3.1A). Este gen codifica para una peroxidasa (*AtPrx4*) catiónica, que presenta un pI teórico de 7.7 como se deduce de su secuencia de aminoácidos y muestra cargas superficiales muy similares a ZePrx (Herrero y cols. 2013b). Esta proteína se induce no solo durante el desarrollo normal de la planta sino también bajo condiciones de estrés, tales como la hipoxia, el estrés oxidativo y la infección por patógenos (Ramirez y cols. 2011, Yang y cols. 2011, Rasul y cols. 2012, Li y cols. 2013). *AtPrx4* se expresa en raíces (Welinder y cols. 2002, Armengaud y cols. 2004, Yang y cols. 2011), hojas (Ramírez y cols. 2011, Rasul y cols. 2012, Wang y cols. 2012) y en cultivos celulares (Guan y Nothnagel, 2004). Sin embargo, a pesar de su estrecha homología con ZePrx, que está altamente expresada en hipocotilos y epicotilos, no hay información de la expresión de *AtPrx4* en el tallo de la inflorescencia de *Arabidopsis*. Con el fin de comprobar la localización de los transcritos de *AtPrx4* se extrajo el RNA de diferentes órganos de las plantas WT. Los resultados mostraron que la expresión de *AtPrx4* se localiza en raíces, hipocotilos, ramas laterales, tallo de la inflorescencia, cotiledones, hojas y flores (Figura 3.1B). Por tanto es un peroxidasa que se expresa tanto en tejidos donde ocurre la lignificación como en otros donde este fenómeno es menos frecuente, como son las flores.

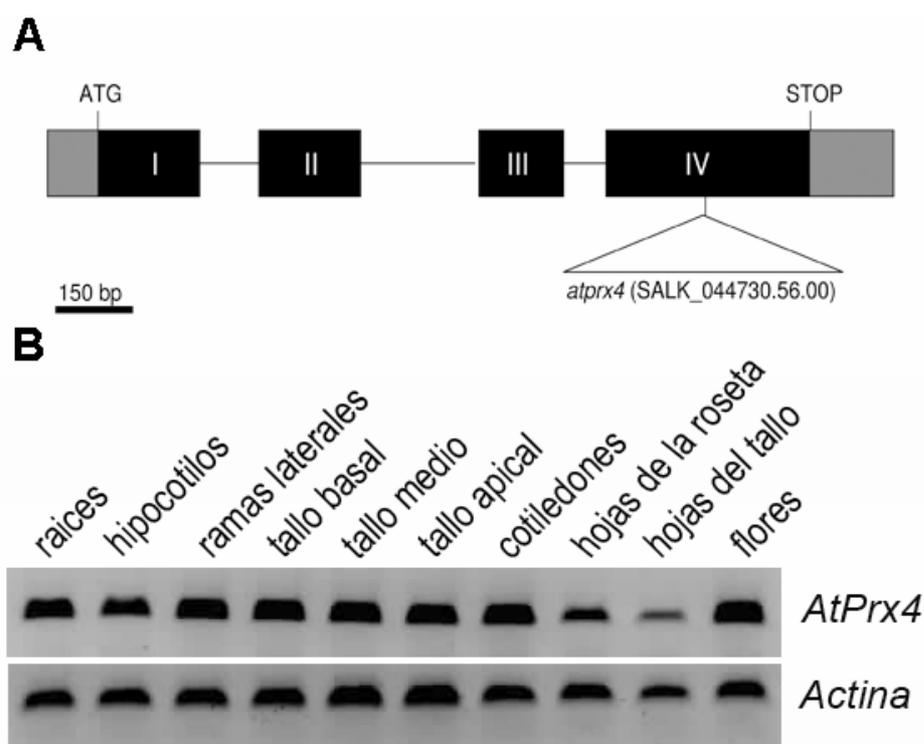


Figura 3.1. (A) Localización del inserto de T-DNA en el mutante de la peroxidasa 4. En gris se muestran los extremos 5' y 3' UTR; en negro los exones y las líneas que los conectan los intrones. (B) Localización mediante RT-PCR del transcrito correspondiente a *AtPrx4* en diferentes órganos de plantas WT de *A. thaliana*. Como gen de referencia se utilizó la actina.

1.2. Efecto del noqueo de *AtPrx4* sobre el crecimiento, la composición de la pared y la cantidad de lignina

Para conocer el efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx4* lo primero que se realizó fue un análisis del crecimiento de las plantas mutantes y un análisis comparativo con los individuos WT. Tanto las plantas *atprx4* como las silvestres se cultivaron en condiciones de día largo (16/8h luz/oscuridad) y condiciones de día corto (8/16h luz/ oscuridad). En principio cabe esperar que las alteraciones fenotípicas sean más aparentes en plantas crecidas en condiciones de día largo, donde el fenómeno de la lignificación será más determinante. En plantas cultivadas bajo fotoperiodo de día largo, el tallo de la inflorescencia completó su crecimiento 42 días después de la siembra (Figura 3.2A). En cambio, en las plantas cultivadas bajo condiciones de día corto el crecimiento se completó 10 días más tarde. El crecimiento de la roseta también finalizó antes en plantas cultivadas en condiciones de día largo (Figura 3.2C), transcurridos 31 días después de la siembra, lo cual esta de acuerdo con Boyes

y cols. (2001). Aunque el crecimiento se completó más tarde en condiciones de día corto, el área de la roseta y la longitud del tallo fue mayor en las plantas cultivadas en estas condiciones, lo cual es de esperar ya que el déficit lumínico provoca este tipo de alteraciones en las plantas. No se observaron diferencias significativas entre plantas WT y mutantes en cuanto a los parámetros de crecimiento en plantas cultivadas bajo condiciones de día largo (Figura 3.2A, C), al igual que en plantas cultivadas con fotoperiodo de día corto (Figura 3.2B, D). La ausencia de cambios fenotípicos diferenciales en mutantes con respecto al WT ha sido descrito en plantas que presentan alterada la ruta de biosíntesis de las ligninas, en las que se suprime la expresión de algunos enzimas como 4CL (Xu y cols 2011), CCR (Tamasloukht y cols. 2011) o CAD (Fornalé y cols. 2012).

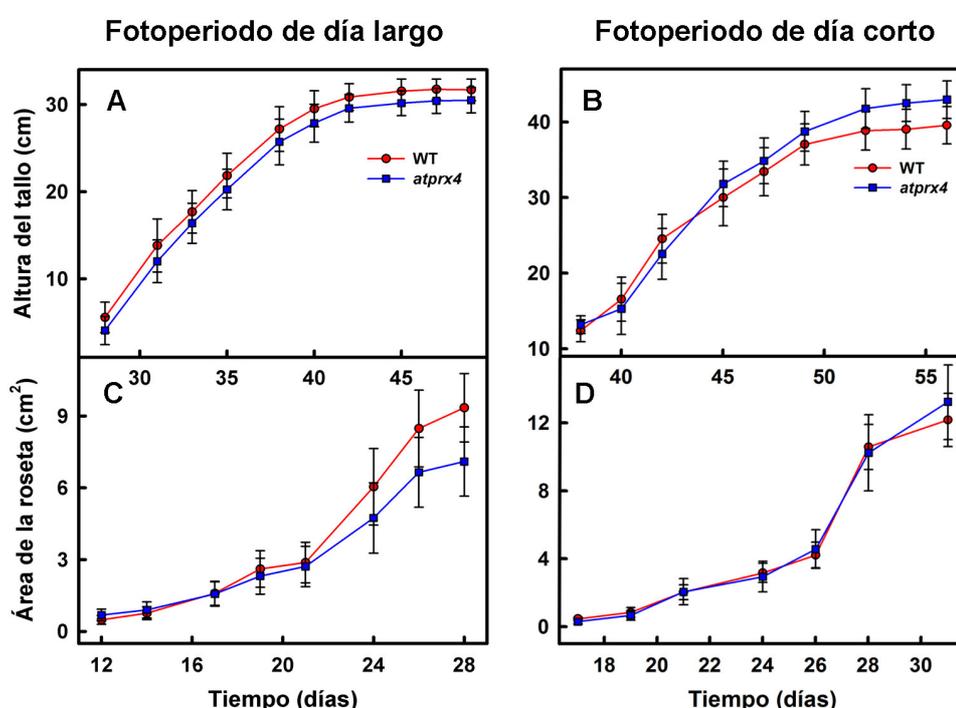


Figura 3.2. Altura del tallo principal de la inflorescencia (A y B) y superficie foliar de la roseta (C y D) de plantas WT y *atprx4* crecidas bajo condiciones de fotoperiodo de día largo 16/8h luz/ oscuridad (A y C) y de día corto 8/16h luz/oscuridad (B y D).

Se sabe que la luz induce tanto el metabolismo fenilpropanoide como la ruta de biosíntesis de la lignina (Hemm y cols. 2004). Por esta razón, mediante el método de bromuro de acetilo (Iiyama y Wallis 1988) se cuantificó el contenido de lignina en las paredes celulares obtenidas del tallo de la inflorescencia tanto de plantas WT como de *atprx4* cultivadas bajo fotoperiodo tanto de día largo como de día corto (Tabla 1). La cantidad de lignina en plantas WT crecidas en

fotoperiodo de día corto fue ligeramente menor que en las de día largo, lo que indica que la luz activa la ruta de biosíntesis de ligninas. Las plantas mutantes cultivadas en condiciones de día corto no mostraron diferencias en comparación con las plantas WT (134 mg lignina g⁻¹ pared celular). En cambio, en condiciones de día largo el contenido de lignina de las plantas mutantes se vio disminuido en un 37% en comparación con las plantas WT (Tabla 1). Se sabe que cuando las condiciones para el crecimiento de la planta no son óptimas (día corto), éstas usan el carbono disponible para la síntesis de azúcares y no para sintetizar lignina, ya que este carbono no puede ser reutilizado una vez que se ha incorporado al polímero de lignina. Por tanto el bloqueo de la expresión de *AtPrx4* sólo parece afectar al contenido de lignina cuando las plantas se cultivan en condiciones de día largo, lo que sugiere que *AtPrx4* participa en la lignificación sólo en determinadas condiciones ambientales y además esta peroxidasa podría estar regulada por la luz.

Tabla 1. Contenido de lignina determinado mediante bromuro de acetilo, (mg de lignina g⁻¹ de pared celular) en plantas WT y *atprx4* crecidas bajo condiciones de día corto o condiciones de día largo. El asterisco indica diferencias significativas con un valor de P<0.05 con respecto al WT.

	Día corto	Día largo
WT	134 ± 19	145 ± 14
<i>atprx4</i>	134 ± 14	91 ± 11*

El análisis mediante FTIR aporta información en cuanto a la composición de las paredes celulares. Por ello se realizó un estudio de la composición de las paredes celulares por FTIR en el intervalo de longitud de onda comprendido entre 800-1800 cm⁻¹ (Figura 3.3A). Con el fin de localizar mejor aquellas zonas alteradas en el espectro de FTIR se realizó una sustracción de espectros entre el WT y *atprx4* (Figura 3.3B). Algunas diferencias se produjeron en las regiones correspondientes a los hidratos de carbono entre 800 y 1200 cm⁻¹ (Figura 3.3B). Dentro de esta región, celulosa, pectina, ramnogalacturonano y xiloglucano tiene picos superpuestos (McCann y cols. 1992) y por lo tanto, las alteraciones observadas no se pueden asignar a ninguno de estos compuestos en particular. Por otra parte, se observó una alteración en la banda comprendida entre 1505-1496 cm⁻¹ (Figura 3.3B), zona que se corresponde con alteraciones en la proporción de unidades G y S, que se ve alterada cuando el contenido en unidades G es mayor que el de unidades S (Faix 1991, Faix y cols. 1991). Estos

resultados sugieren que las paredes celulares de *atprx4* presentan alteraciones en la composición de ligninas en comparación con el WT.

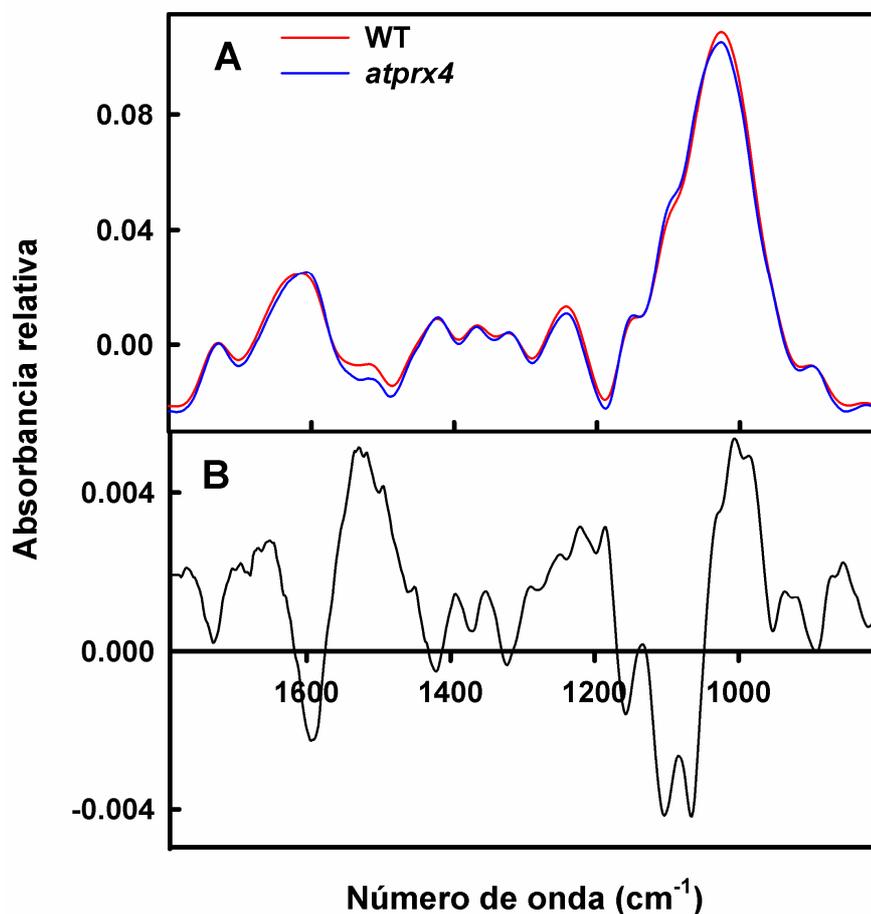


Figura 3.3. Espectros de FTIR obtenidos de las paredes celulares de WT y *atprx4* (A) y la diferencia de espectros (B). Cada espectro medio es el resultado de la media de cinco muestras individuales.

I.3. Alteración de la composición de ligninas en mutantes *atprx4*

Una reducción en el contenido de lignina puede venir acompañada de un cambio en la composición monomérica de la misma, aunque a veces, pueden darse cambios en dicha composición sin que se altere la cantidad de lignina. Mediante el análisis por tioacidólisis de plantas maduras (63 días después de la siembra), se observó una disminución de las unidades S y un ligero aumento de las unidades G en plantas WT crecidas bajo condiciones de fotoperiodo de día largo en comparación con plantas WT crecidas bajo fotoperiodo de día corto. Estos resultados sugieren que los monómeros S sólo se sintetizan bajo

determinadas condiciones lumínicas, ya que además la oscuridad inhibe la síntesis de unidades S (Ruegger y cols. 1999).

Tabla 2. Determinación mediante tioacidólisis de la composición monomérica de las paredes celulares y del ratio S/G en plantas WT y *atprx4* crecidas bajo condiciones de día corto o de día largo. El asterisco indica diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$ con respecto al WT.

	H:G:S		S/G ratio	
	Día corto	Día largo	Día corto	Día largo
WT	1:66:33	1:60:39	0.50	0.65
<i>atprx4</i>	1:65:34	2:66:32	0.52	0.48*

Cuando las plantas *atprx4* y WT fueron cultivadas bajo condiciones de día largo, las plantas *atprx4* incrementaron la proporción de unidades G a la vez que disminuían las unidades tipo S. Este resultado confirma el encontrado mediante FTIR en la banda comprendida entre los 1505-1496 cm^{-1} (Figura 3.3). Esta alteración en la composición monomérica provoca como consecuencia una disminución del ratio S/G, desde 0.65 en el WT hasta 0.48 en plantas *atprx4*. Estas alteraciones no se observaron entre plantas WT y *atprx4* crecidas en condiciones de fotoperiodo de día corto lo cual sugiere que esta peroxidasa podría estar regulada por la luz. La disminución de unidades S conlleva la reducción de la expresión de F5H, COMT y las peroxidases de tipo siringilo. En el caso de la F5H, Ruegger y cols. (1999) observaron que esta enzima se encontraba sobrepresada en plantas crecidas bajo condiciones de día largo. Además cuando las plantas crecidas en condiciones de día corto se pasaban a condiciones de día largo esta enzima incrementaba su expresión. En cuanto a la regulación de las peroxidases por la luz, ésta no está del todo clara, ya que se ha observado tanto una inducción como una represión de su expresión. Se ha visto que ZePrx (la cual muestra gran similitud con AtPrx4), presenta una actividad catalítica menor frente al alcohol sinapílico cuando las plantas crecen en condiciones de oscuridad (J Gutiérrez, comunicación personal).

Teniendo en cuenta que sólo se encontraron diferencias cuando las plantas fueron cultivadas bajo fotoperiodo de día largo, se comprobó si estas diferencias eran dependientes, además de la fase de crecimiento. De esta manera, plantas cuyo tallo principal de la inflorescencia medía 15 cm, se

dividieron en tres secciones de 5 cm cada una desde la base hasta el ápice, se extrajeron las paredes y se analizaron por separado mediante tioacidolisis (Tabla 3). Los resultados mostraron cambios en la composición monomérica en los primeros 5 cm basales del tallo, que refleja los resultados de las plantas maduras, con un incremento en la proporción de unidades tipo G y una disminución en la proporción de unidades S de las plantas *atprx4* con respecto al WT.

Tabla 3. Composición monomérica, analizada mediante tioacidolisis, de las ligninas de la pared celular en la parte basal, media y apical en tallos de 15 cm de plantas WT y *atprx4* crecidas bajo condiciones de fotoperiodo de día largo. Los datos se presentan como la media y las desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco indica diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$ con respecto al WT.

	G:S						Ratio S/G		
	Basal		Medio		Apical		Basal	Medi	Apical
	G	S	G	S	G	S	o		
WT	70 ± 3	30 ± 3	81 ± 1	19 ± 1	93 ± 1	7 ± 1	0.43	0.23	0.08
<i>atprx4</i>	75 ± 1	25 ± 1	85 ± 4	15 ± 4	94 ± 0	6 ± 0	0.33*	0.18	0.06

Las unidades S se incorporan en el polímero de lignina mediante el proceso de polimerización lineal, en el cual se añaden constantemente los monómeros dando lugar a un polímero poco ramificado donde predominan las uniones β -O-4. Por lo general, la lámina media y las paredes celulares primarias están constituidas por un polímero de lignina muy ramificado constituido principalmente por unidades G, donde predominan las uniones C-C (Sarkanen 1971). Por el contrario, las ligninas que se depositan en la pared celular secundaria en tejidos maduros son ricas en unidades S, dando lugar a un polímero más lineal con mayor número de enlaces β -O-4. Esto podría explicar por qué las diferencias entre *atprx4* y WT se limitan a partes basales. El efecto de la mutación por tanto además de depender de las condiciones de cultivo también depende de la edad de la planta ya que se observaron alteraciones en la composición de lignina únicamente en la parte basal del tallo de la inflorescencia (Tabla 3). Cuando los segmentos internodales se encuentran en elongación (parte media y especialmente apical del tallo), el metabolismo relacionado con el crecimiento prevalece sobre la biosíntesis de ligninas y por tanto la supresión de *AtPrx4* no afecta a la composición de las ligninas. Una vez que la elongación cesa (parte basal del tallo), la alteración en la composición de lignina en las plantas mutantes se hace patente, lo que sugiere que esta

peroxidasa probablemente participa en la última etapa de la lignificación, en la cual se incorporan principalmente unidades tipo S al polímero de lignina.

I.4. Efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx4* en los tejidos lignificados del tallo de *A. thaliana*

Debido a que no se encontraron diferencias ni fenotípicas, ni en cantidad y composición de lignina entre los individuos WT y *atprx4* en condiciones de día corto no se realizó ninguno de los análisis posteriores en esas condiciones y por tanto, los datos mostrados a continuación se refieren únicamente a plantas crecidas en condiciones de día largo. Dado que en las angiospermas las ligninas de tipo siringilo se encuentran fundamentalmente en las fibras interfasciculares, mientras que en los vasos de los haces vasculares predomina principalmente las ligninas de tipo guaiacilo, se realizaron análisis histoquímicos para localizar en los distintos tejidos el efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx4*. La tinción con azul de toluidina no mostró diferencias entre las paredes celulares de *atprx4* y del WT (Figura 3.4A, B). La tinción con floroglucinol reveló que la presencia de ligninas se restringió a los haces vasculares y a las fibras interfasciculares (Figura 3.4C, D). Significativamente, la tinción fue menos intensa en las fibras interfasciculares del mutante, lo cual confirma el dato obtenido en la Tabla 1 en la que se mostraba que la cantidad de lignina es menor en *atprx4* que en el WT. Sin embargo, la intensidad de la tinción con floroglucinol en los vasos fue similar en las plantas *atprx4* y WT. Como se demostró anteriormente en la Tabla 2, en plantas WT cultivadas en condiciones de día corto disminuyen las unidades S y aumenta las G, lo cual podría deberse a que prevalezca la lignificación de los haces vasculares sobre la de las fibras interfasciculares en condiciones de crecimiento adversas. Esta ganancia de unidades G implica una disminución de la flexibilidad del tallo pero el mantenimiento de unos haces vasculares funcionales (Bonawitz y Chapple. 2010). Dado que *AtPrx4* es una peroxidasa básica que no presenta restricciones estructurales para oxidar el alcohol sinapílico, se realizó la tinción de Mäule, que es específica para ligninas ricas en unidades S (Pomar y cols. 2002). Los vasos del xilema se tiñeron de color marrón, lo cual indicó que las ligninas en esta zona se componían principalmente de unidades guaiacilo, mientras que la tinción fue roja en las fibras interfasciculares debido a la presencia de grupos siringilo, tanto en el WT como en *atprx4* (Figura 3.4E, F). Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en la

tiacidolisis, no se encontraron diferencias notables entre las plantas WT y *atprx4*.

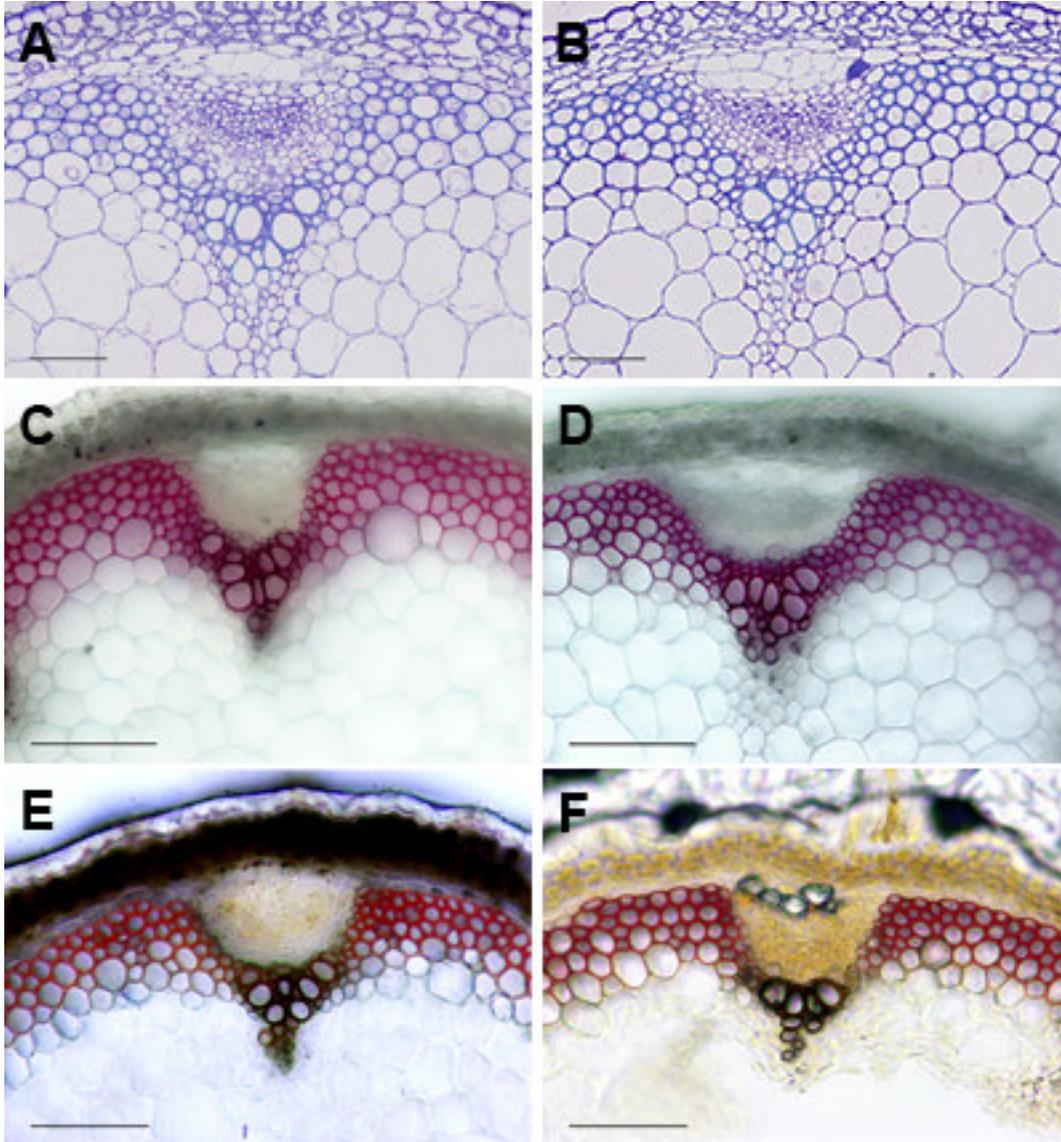


Figura 3.4. Secciones transversales de plantas WT (A, C, E) y *atprx4* (B, D, F) crecidas bajo condiciones de fotoperiodo de día largo teñidas con azul de toluidina (A-B), floroglucinol (C-D) y Mäule (E-F). Barras: 100 μ m.

Para profundizar aún más se realizó un análisis de la ultraestructura de las paredes de los vasos del xilema y de las fibras interfasciculares mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 3.5). En las fibras interfasciculares del mutante, la lámina media presentó una menor densidad al paso de los electrones lo cual podría indicar un retraso en el patrón de la

lignificación en las fibras interfasciculares (Figura 3.5). Además, la zona de transición entre la pared celular primaria y secundaria es más difusa en el mutante, lo que sugiere algunos cambios a nivel de los patrones de disposición de la celulosa. De hecho, mediante los espectros de FTIR ya se observaron algunos cambios en la composición en los hidratos de carbono (Figura 3.3), aunque no se pudo determinar a qué tipo de carbohidratos se correspondían.

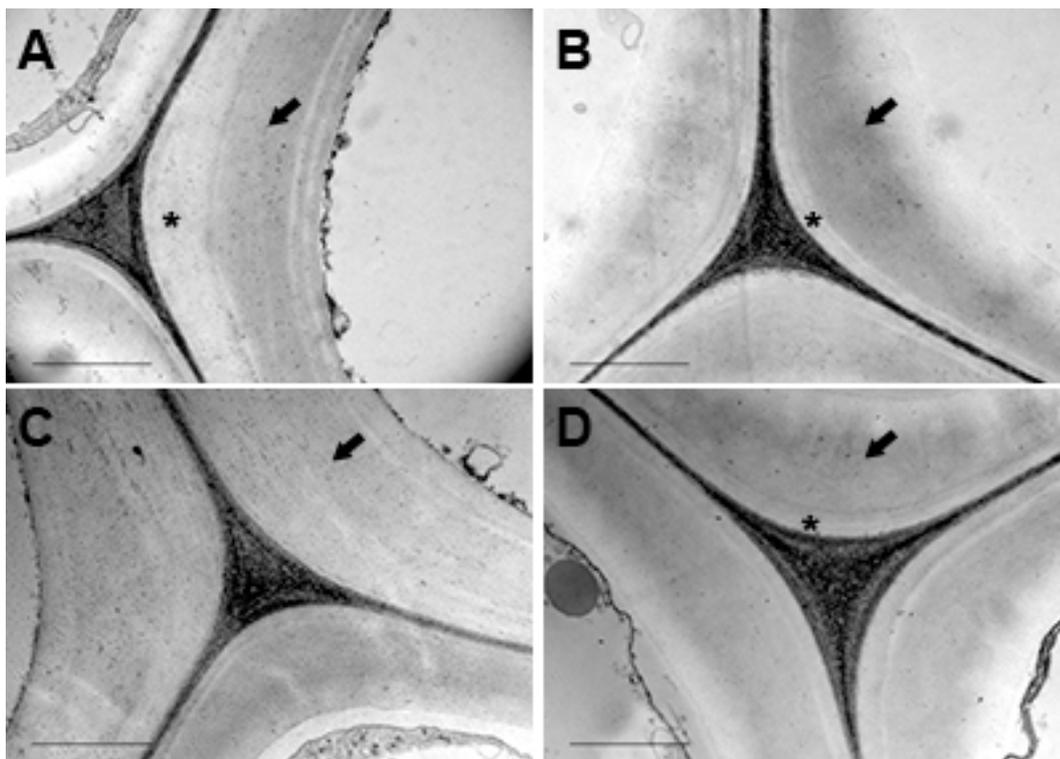


Figura 3.5. Microscopía electrónica de transmisión de las paredes celulares de los vasos (A, C) y de las fibras interfasciculares (B, D) de WT (A, B) y *atprx4* (C, D). El asterisco indica la posición de la pared primaria y las flechas la localización de la pared secundaria. Barra: 1 μ m.

I.5. Efecto de la supresión de *AtPrx4* en la redistribución de esqueletos carbonados y en genes implicados en la biosíntesis de la pared celular

Con el fin de comprobar si la supresión de la última enzima de la ruta de biosíntesis de ligninas conduce a una represión de toda la ruta o una redistribución de los compuestos intermedios, se analizó la expresión de algunos genes implicados en la biosíntesis de las ligninas, tales como *PAL*, *4CL*, *CCR*, *F5H* y *CAD*. Los resultados mostraron una disminución de la expresión de todos

los genes implicados en la biosíntesis de la lignina (Figura 3.6A), desde el punto de entrada a la ruta fenilpropanoide (*PAL*), hasta los genes específicos implicados en la biosíntesis de monómeros S (*F5H*). La baja expresión de *F5H*, junto con la supresión de *AtPrx4* podría explicar la disminución de las unidades tipo S que se describen en la Tabla 2. El hallazgo de alteraciones en los hidratos de carbono mediante FTIR (Figura 3.3) nos llevó a analizar los niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de otros componentes de la pared celular. Por este motivo se analizaron los genes de la celulosa sintasa que están específicamente implicados en la síntesis de pared secundaria (*CesA7* y *CesA8*) y un gen que participa en la síntesis de los xilanos (*FRA8*). En ambos casos la expresión se redujo casi en un 40% en el mutante en comparación con el WT (Figura 3.6B).

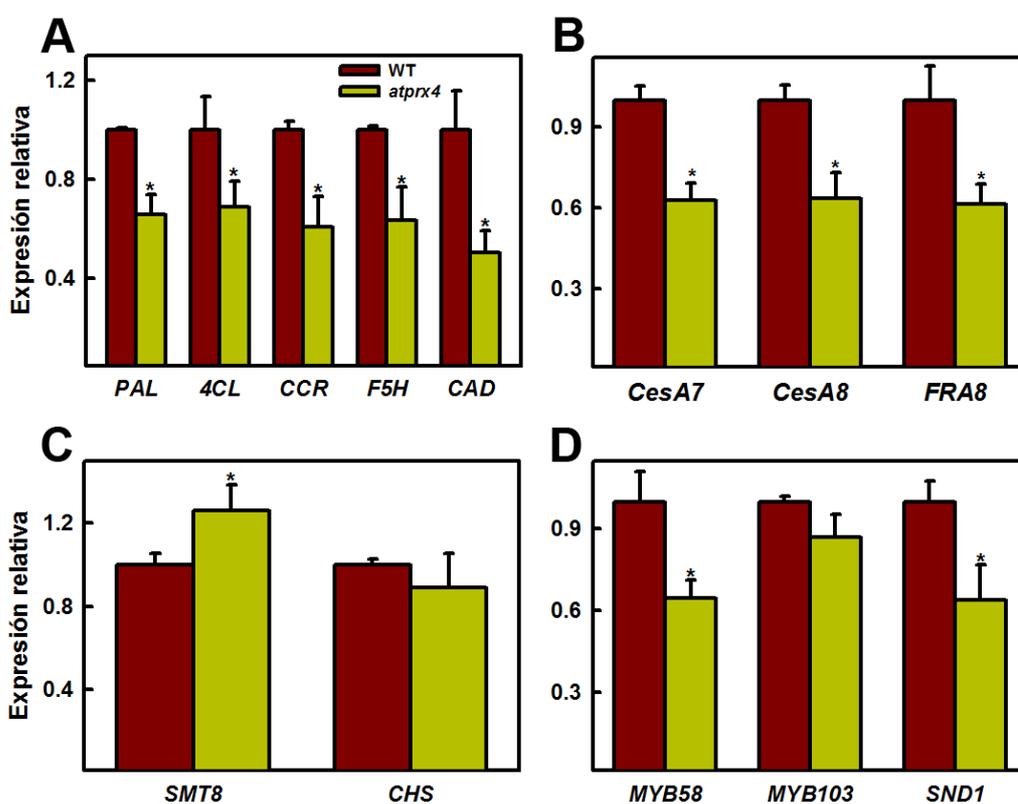


Figura 3.6. Efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx4* sobre genes implicados en la ruta de biosíntesis de las ligninas (A), de celulosa y xilanos (B), de ésteres sinapato y flavonoides (C), factores de transcripción que regulan la síntesis de la pared celular (D). En todos los casos el gen de la actina se usó como gen de referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. El asterisco indica diferencias significativas entre plantas WT y plantas mutantes, con un valor de $P < 0.05$.

Esta disminución en la expresión de los genes está de acuerdo con los resultados obtenidos con FTIR, en los que el WT mostró una mayor intensidad

para los números de onda relacionados con los hidratos de carbono (Figura 3.3). Con el fin de conocer si otras rutas del metabolismo fenilpropanoide se veían afectadas por la disminución de la expresión de *AtPrx4*, se determinaron los niveles de expresión de *CHS*, que está implicada en la biosíntesis de flavonoides, y *SMT8* que participan en la formación de ésteres sinapato. Se sabe que la supresión de genes implicados en la biosíntesis de ligninas puede afectar al flujo de compuestos intermedios hacia otras vías que están interconectadas con ésta (Besseau et al. 2007). En el mutante únicamente se observó un ligero pero significativo aumento de la expresión de *SMT8* (Figura 3.6C), lo cual sugiere que se produce una distribución del carbono fijado durante la fotosíntesis hacia la síntesis de ésteres sinapato.

Por otra parte, se analizó la expresión de factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de lignina (*MYB58*) (Zhong y cols. 2006), el engrosamiento de la pared celular secundaria en fibras y haces vasculares (*MYB103*) (Zhong y cols. 2008) y el engrosamiento de la pared celular secundaria en las fibras interfasciculares (*SND1*); (Zhong y cols. 2006) (Figura 3.6D). *MYB58* presentó una menor expresión en el mutante, lo cual es de esperar ya que los genes que regula no se encontraban sobrepresados (Figura 3.6A). La expresión de *MYB103* no mostró ningún tipo de alteración, mientras que *SND1* redujo su expresión en un 40% con respecto al WT, lo que indica que la alteración de la expresión de *AtPrx4* afecta a las fibras interfasciculares. *MYB103* a pesar de actuar a nivel de las fibras interfasciculares también lo hace a nivel de los haces por ello no se observó una disminución significativa de su expresión en el mutante con respecto al WT.

**II: EFECTO DEL BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE *ATPRX72* EN
PLANTAS DE *A. THALIANA***

II.1. Localización de la inserción de T-DNA en el gen *AtPrx72* y de su expresión en diferentes órganos de *A. thaliana*

Para caracterizar el papel de *AtPrx72* en la lignificación se utilizaron dos líneas mutantes noqueadas en el gen correspondiente (At5g66390): *atprx72-1* (Salk_136893.44.70) y *atprx72-2* (Sail_891_H09). El mutante *atprx72-1* presenta la inserción en el exón 4 mientras que la línea *atprx72-2* presenta la inserción en el promotor (Figura 3.7A). *AtPrx72* se expresa en diferentes tejidos de la planta como son hipocotilos (Irshad y cols. 2008), raíces y tallos de la inflorescencia (Valério y cols. 2004). Para determinar si *AtPrx72* está implicada en la lignificación, se determinó la presencia de su transcrito mediante RT-PCR en diferentes órganos de plantas WT, con el fin de observar si estaba presente o no en tejidos donde se produce la lignificación.

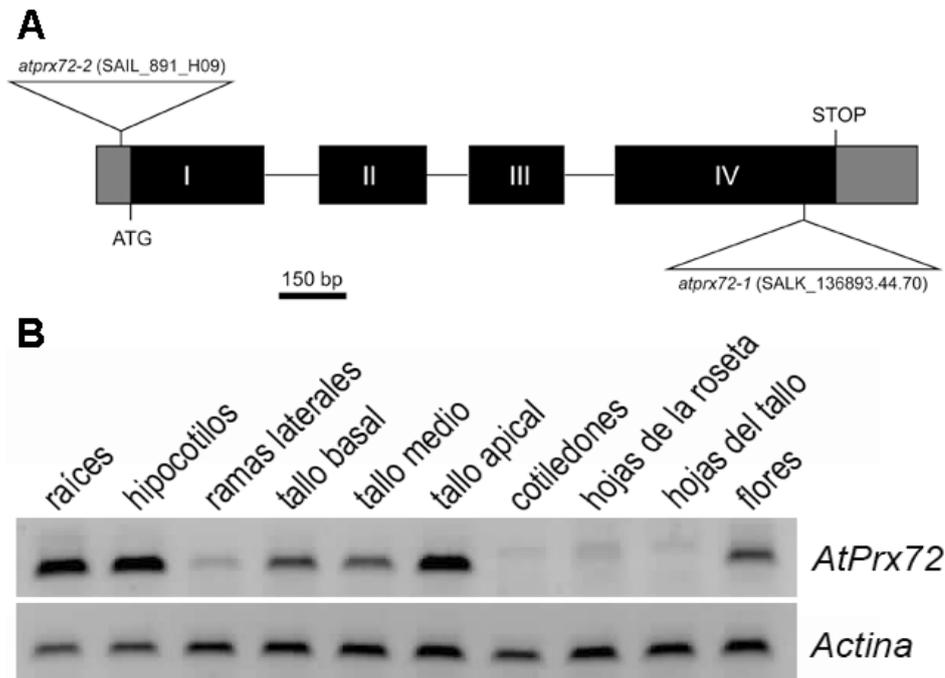


Figura 3.7. (A) Localización del inserto de T-DNA en los mutantes de la peroxidasa 72. En gris se muestran los extremos 5' y 3' UTR; en negro los exones y las líneas que los conectan los intrones. (B) Localización mediante RT-PCR del transcrito correspondiente a *AtPrx4* en diferentes órganos de plantas WT de *A. thaliana*. Como gen de referencia se utilizó la actina.

Como se observa en la Figura 3.7B, *AtPrx72* se expresa en tejidos lignificados como son raíces, hipocotilos y tallos, en cambio su expresión es muy baja en hojas y cotiledones. Estos datos indican que esta peroxidasa se expresa

en tejidos que lignifican, por lo tanto cabe esperar que esté implicada en el proceso de lignificación.

II.2. Efecto del noqueo de la expresión de *AtPrx72* sobre el crecimiento y la composición de la pared celular de *A. thaliana*

Una vez determinada la expresión de *AtPrx72* en tejidos que presentan lignificación se procedió a analizar biométricamente las plantas WT y los mutantes *atprx72-1* y *atprx72-2* utilizando la metodología descrita por Boyes y cols. (2001). El crecimiento del tallo en altura fue menor en los mutantes *atprx72-1* durante toda la fase de crecimiento aunque la altura total que alcanzan estos mutantes acabó siendo la misma que la del WT (Figura 3.8), lo cual sugiere una posible adaptación de la planta a la alteración causada por el bloqueo de la expresión de *AtPrx72*. En cuanto al área de la roseta, el crecimiento de *atprx72-1* siempre se mantuvo por debajo del WT a lo largo de todo el crecimiento (Figura 3.9). El mutante *atprx72-2* no presentó ninguna diferencia ni en altura ni en área de la roseta con respecto al WT (Figuras 3.8 y 3.9). A pesar de ser dos líneas mutantes noqueadas en el mismo gen, la inserción esta localizada en diferentes zonas del mismo. Probablemente la inserción en el promotor del gen sea menos eficiente que la que se produce en el exón, lo cual explicaría por qué *atprx72-1* muestra diferencias en su crecimiento con respecto al control mientras que *atprx72-2* no se ve afectado.

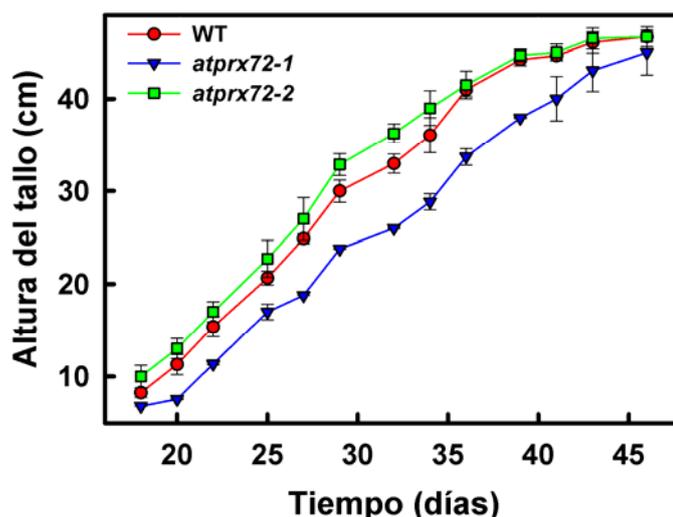


Figura 3.8. Altura del tallo principal de la inflorescencia en plantas mutantes (*atprx72-1* y *atprx72-2*) y en el WT

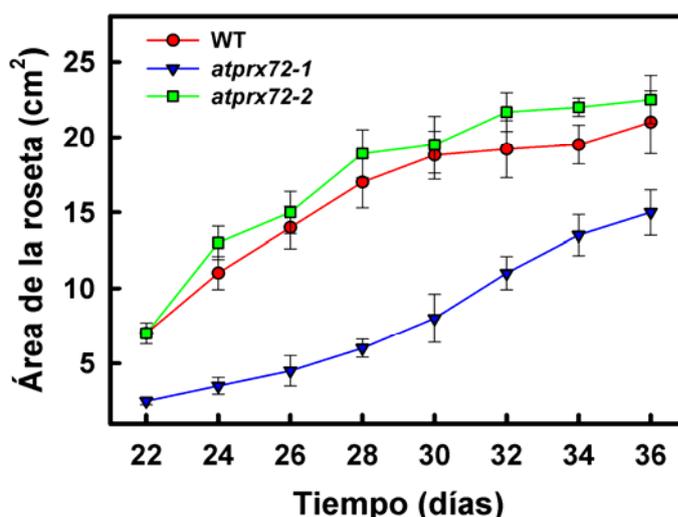


Figura 3.9. Superficie foliar de la roseta en plantas mutantes (*atprx72-1* y *atprx72-2*) y en el WT

El análisis mediante FTIR aporta información relacionada con la composición de las paredes celulares. Los espectros obtenidos a partir de las paredes de los tallos de *A. thaliana* fueron similares pero con pequeñas diferencias entre el WT y los mutantes (Figura 3.10A). En la banda localizada entre los 1500-1650 cm^{-1} , la cual corresponde a la vibración de los esqueletos aromáticos y las uniones C=C de las unidades G y S de las ligninas (Rana y cols. 2010), se observaron diferencias entre el WT y los mutantes (Figura 3.10B). La altura del pico en esta región fue menor en *atprx72-1* en comparación con el WT, por tanto cabe esperar que el contenido de lignina sea menor. Además, el pico correspondiente a 1421 cm^{-1} , en el cual se encuentran las uniones C-H asociadas a los grupos $-\text{O}-\text{CH}_3$, es menor también en este mutante (Figura 3.10B). Esto podría deberse a una disminución de las unidades S de las ligninas ya que, en comparación con las H y las G tienen mayor número de uniones $-\text{O}-\text{CH}_3$ (Popuescu y cols. 2007). En el caso de *atprx72-2* ocurre lo contrario, sin embargo en la zona entre 1230-1268 cm^{-1} (correspondiente a la vibración de los enlaces C-O de las unidades G y S de las ligninas) (Popuescu y cols. 2007) el pico es menor que en el WT.

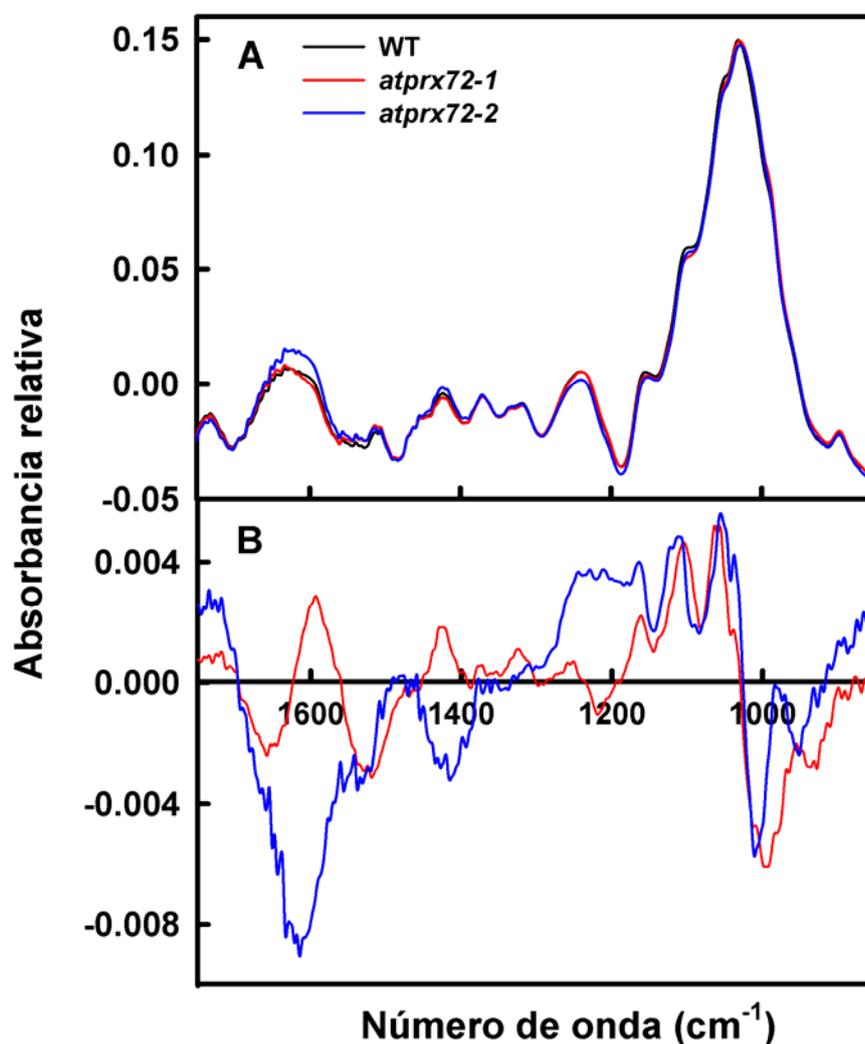


Figura 3.10. Espectros de FTIR obtenidos de las paredes celulares de WT, *atprx72-1* y *atprx72-2* (A) y la diferencia de espectros (B). Cada espectro medio es el resultado de la media de cinco muestras individuales.

Estos resultados encontrados en *atprx72-2* posiblemente se deban a una ligera alteración en la estructura del polímero de lignina pero no en la cantidad de la misma. En la banda localizada entre 1000-1160 cm⁻¹ se encuentran los picos correspondientes a celulosas, hemicelulosas y otros hidratos de carbono de la pared celular (McCann y cols. 2007). En esta zona la diferencia de espectros muestra que para ambos mutantes la variación es muy similar entre ellos pero diferente al WT. Se sabe que una reducción del contenido de lignina puede ir acompañada de una variación de la cantidad o del contenido de los hidratos de carbono, lo cual permite el refuerzo de las paredes celulares (Li y cols. 2003). Para determinar estas variaciones en los hidratos de carbono se

llevó a cabo una hidrólisis ácida de las paredes celulares y su posterior análisis mediante HPLC.

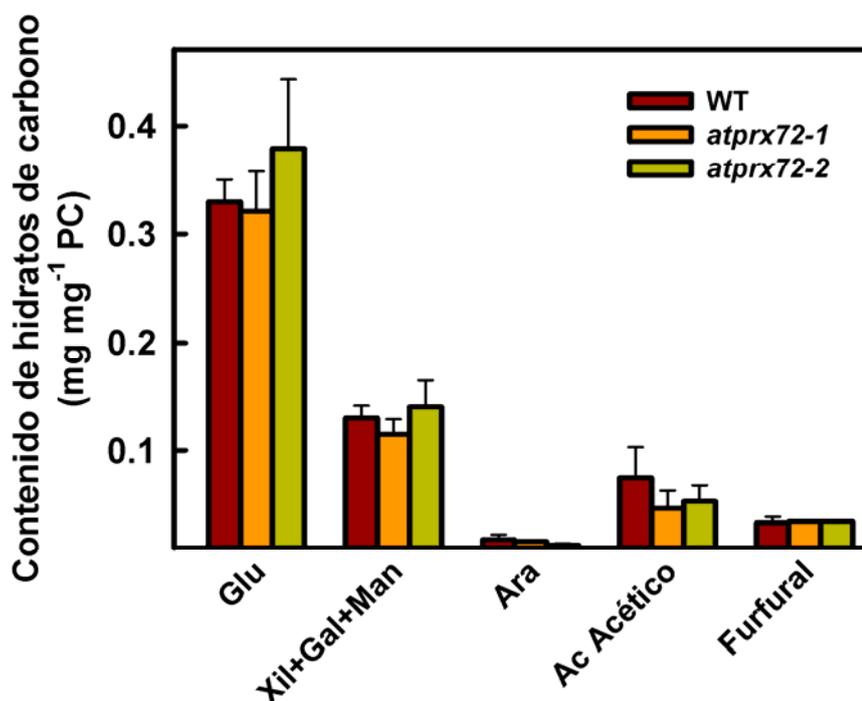


Figura 3.11. Análisis de los hidratos de carbono obtenidos a partir de paredes celulares de plantas WT y plantas mutantes. Glu: glucosa; Xil: xilulosa; Gal: galactosa; Man: manosa; Ara: arabinosa. El ácido acético es derivado de los grupos acetato de las hemicelulosas y el furfural derivado de las pentosas. PC: pared celular.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias entre las plantas WT y los mutantes (Figura 3.11), quizás otro tipo de análisis más preciso sea necesario para confirmar lo observado mediante FTIR, aunque en ciertas ocasiones las alteraciones en la cantidad y composición de ligninas no tienen por qué llevar asociado un cambio en los hidratos de carbono (Voelker y cols. 2010).

II.3. Efecto de la supresión de *AtPrx72* sobre el contenido y la composición de las ligninas

Como se ha mencionado anteriormente, las peroxidasas están involucradas en la última etapa de síntesis de las ligninas, oxidando los alcoholes hidroxicinámicos. Se sabe que la manipulación de las enzimas de esta ruta aporta conocimiento sobre el funcionamiento de la misma. Así, la

reducción de la expresión de estas enzimas suele llevar acompañada una reducción en el contenido de lignina, aunque no se ha conseguido suprimir totalmente la biosíntesis de este polímero, lo cual indica que las plantas han desarrollado mecanismos enzimáticos alternativos que permiten la síntesis de un polímero funcional (Chabannes y cols. 2001, Sibout y cols. 2005). Para determinar el efecto de la supresión de *AtPrx72* en el contenido de lignina, se realizó una cuantificación de dicho polímero a partir del tallo de la inflorescencia. En ambos mutantes el contenido de lignina fue menor que en el WT pero solamente en *atprx72-1* fue significativo, produciéndose una reducción del contenido de lignina en un 30% con respecto al control (Tabla 4). Resultados similares se encontraron en los mutantes *cad-c cad-d* (Sibout y cols. 2005), en los cuales se bloqueó la expresión de CAD, enzima que conduce a la formación de los alcoholes hidroxicinamílicos. Li y cols. (2003) observaron una disminución del contenido total de lignina cuando se suprimía en álamo la expresión de PrxA3a, una peroxidasa ácida. Por lo general, una reducción en el contenido de lignina suele venir acompañada de cambios en la composición monomérica de la misma, por lo tanto se llevó a cabo un análisis mediante la oxidación con nitrobenzono (ONB). Las plantas WT mostraron una relación H:G:S de 1:64:35 típica de *Arabidopsis* (Rogers y cols. 2005, Sibout y cols. 2005), al igual que ocurrió con los mutantes (Tabla 4). Sin embargo, la ONB no mostró diferencias en la composición monomérica del polímero de lignina entre mutantes y plantas WT

Tabla 4. Contenido de ligninas determinado por bromuro de acetilo y composición monomérica determinada por tioacidolisis y nitrobenzono a partir de paredes obtenidas de plantas maduras WT y mutantes. PC: pared celular; ONB: oxidación con nitrobenzono. El asterisco indica diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$ con respecto al WT.

	Ligninas (mg g ⁻¹ PC)	H:G:S		S/G	
		ONB	Tioacidolisis	ONB	Tioacidolisis
WT	159 ± 16	1:64:35	1:60:39	0.5	0.70
<i>atprx72-1</i>	104* ± 17	2:63:35	1:64:35	0.5	0.50*
<i>atprx72-2</i>	146 ± 14	1:63:36	Tr:64:36	0.5	0.60

La tioacidolisis es otra técnica que permite conocer no solo la composición monomérica de la lignina sino también aporta información sobre la estructura, ya que solubiliza los enlaces β-éter (Lapierre y cols. 1995). Los resultados obtenidos mediante tioacidolisis fueron similares a los obtenidos por

nitrobenzeno, excepto para las unidades S de las ligninas que se vieron incrementadas en el WT (Tabla 4), lo cual es de esperar, ya que la tioacidolisis solubiliza los enlaces β -O-4, que son las uniones a través de las cuales las unidades S se unen al polímero de lignina (Lapierre y cols. 1995). Con esta técnica se observó una reducción significativa del ratio S/G en *atprx72-1* con respecto al WT (0.7 en el WT y 0.5 en *atprx72-1*) (Tabla 4). Li y cols. (2003) observaron una disminución en las unidades G cuando suprimían la expresión de PrxA3a, sin embargo el bloqueo de la expresión de una peroxidasa ácida en tabaco no tuvo efecto sobre la composición de la lignina (Lagrimini y cols. 1997). Esta reducción en unidades S pone de manifiesto que la peroxidasa es capaz de actuar sobre el alcohol sinapílico.

Además de la composición monomérica, la tioacidolisis aporta información sobre la estructura del polímero de lignina. Como muestra la Tabla 5, en *atprx72-1* se produce un incremento del ratio $\sum\beta$ -O-4/ \sum O-4 con respecto al control (60.6 y 25.4 respectivamente), originándose un polímero de lignina más lineal (Durbeej y Eriksson 2003). Este aumento de la linealidad se produce principalmente como consecuencia de un descenso del sumatorio de los enlaces O-4 terminales, responsables de la aparición de puntos de ramificación en el polímero de lignina. Las unidades S suelen incorporarse al polímero de lignina en crecimiento en la última etapa de síntesis, por tanto es de esperar que las alteraciones en la composición monomérica de la lignina en los mutantes *atprx72* ocurra en plantas maduras.

Tabla 5. Relación entre los distintos tipos de enlaces determinados por tioacidolisis. $\sum\beta$ -O-4 es el sumatorio de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter derivadas de los enlaces β -O-4, \sum O-4 representa la cantidad de enlaces O-4 terminales. El asterisco indica diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$ con respecto al WT.

	$\sum\beta$ -O-4	\sum O-4	$\sum\beta$ -O-4/ \sum O-4
WT	620.7	24.5	25.3
<i>atprx72-1</i>	281.2	4.6	60.6*
<i>atprx72-2</i>	510.3	24.1	21.2

Para confirmar esta última hipótesis, se analizaron tallos de 15 cm de plantas WT y mutantes mediante tioacidolisis y bromuro de acetilo. Como se observa en la Tabla 6 no aparecieron diferencias significativas entre los mutantes y el WT en plantas de 15 cm. Además, el porcentaje de unidades S fue en todos los casos menor en comparación con los datos obtenidos a partir de plantas maduras, como era de esperar dado que las unidades S se incorporan

en fases de crecimiento tardías. Todos estos datos apuntan a que AtPrx72 está implicada en la lignificación de paredes celulares actuando solamente en los estadios finales de dicho proceso.

Tabla 6. Contenido de ligninas y composición monomérica determinada por tioacidólisis a partir de paredes procedentes de tallos de 15 cm de altura y de plantas maduras. PC: pared celular; Tr: trazas. Los asteriscos indican diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$ con respecto al WT.

	Tallos de 15 cm de altura			Plantas maduras		
	Ligninas	H:G:S	S/G	Ligninas	H:G:S	S/G
	(mg g ⁻¹ PC)			(mg g ⁻¹ PC)		
WT	104 ± 12	Tr:75:25	0.33	159 ± 16	1:60:39	0.70
<i>atprx72-1</i>	96 ± 6	Tr:75:25	0.33	104 ± 17*	1:64:35	0.50*
<i>atprx72-2</i>	103 ± 9	Tr:76:23	0.29	146 ± 14	tr:64:36	0.60

II.4. Efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx72* en los tejidos lignificados del tallo de *A. thaliana*

Teniendo en cuenta que las peroxidases catalizan el último paso en la ruta de biosíntesis de las ligninas y conociendo la gran homología de AtPrx72 con ZePrx, se analizó el efecto de la mutación sobre los haces vasculares y las fibras interfasciculares. La tinción con azul de toluidina mostró que el mutante *atprx72-1* presentaba unas paredes celulares más delgadas tanto en las células de los haces vasculares como en las de las fibras interfasciculares (Figura. 3.12A, B) aunque fue mucho más marcada en las fibras interfasciculares, llegando incluso a no apreciarse la tinción en algunas zonas.

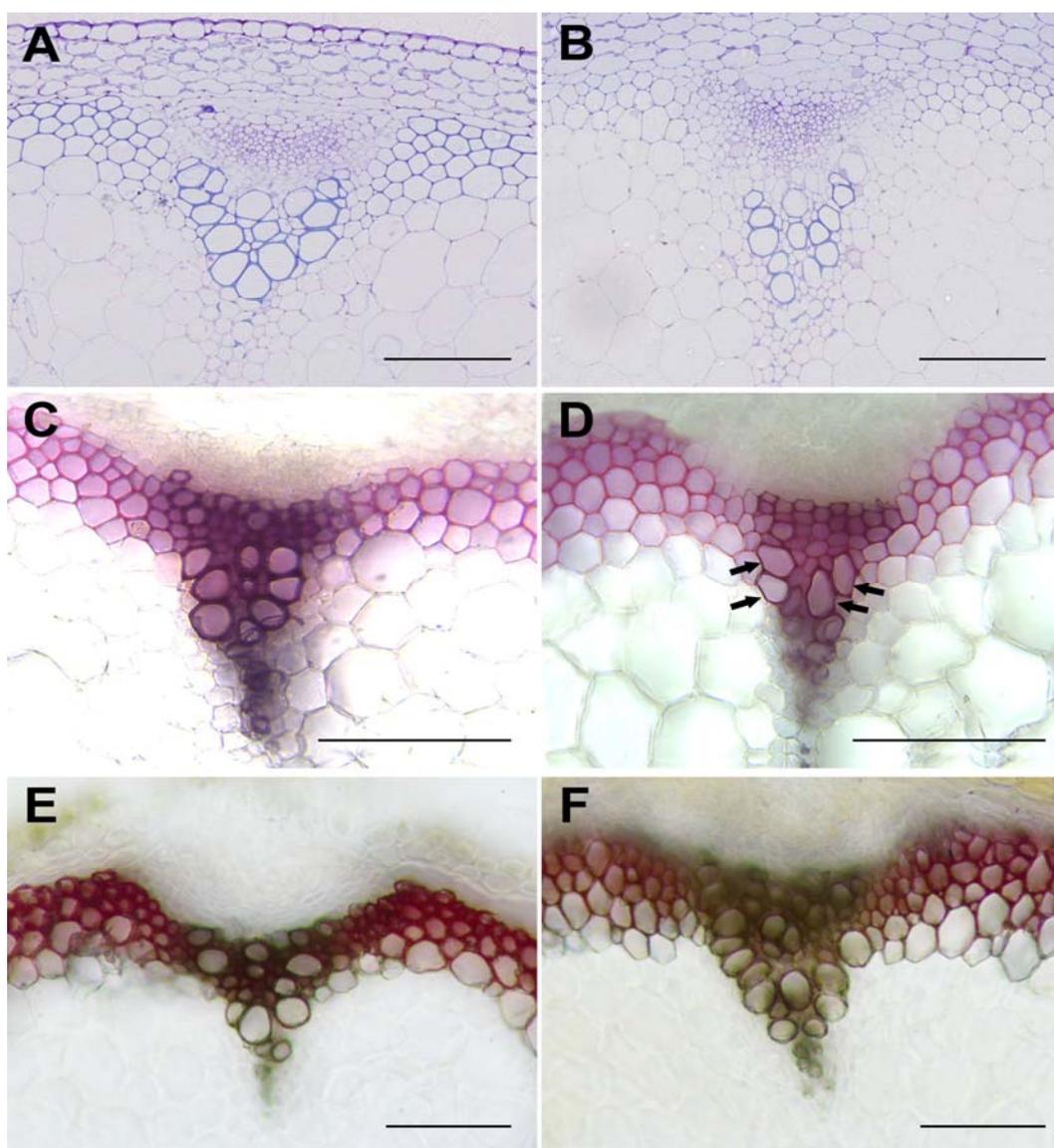


Figura 3.12. Secciones transversales de plantas WT (A, C, E) y *atprx72-1* (B, D, F) teñidas con azul de toluidina (A-B), floroglucinol (C-D) y Mäule (E-F). Barras: 100 μ m

La tinción con floroglucinol (Figura 3.12C, D) la cual es específica para los grupos cinamaldehído presentes en las ligninas, fue menor también en *atprx72-1*, tanto en los haces vasculares como en las fibras interfasciculares, lo cual confirma el dato obtenido en la Tabla 4, en la que se observa una reducción del contenido de lignina de un 30% en *atprx72-1* con respecto al WT. Además, algunos de los vasos de los haces vasculares de *atprx72-1* presentaban un colapso parcial, debido posiblemente a unas paredes menos lignificadas y más delgadas. Este fenómeno se ha observado en mutantes que presentaban un bloqueo de la expresión de *irx3*, un componente de la celulosa sintasa (Taylor y cols. 1999). Ya que AtPrx72 podría oxidar el alcohol sinapílico debido a su

estructura homologa a la ZePrx (Herrero y cols. 2013b) se realizó el test de Mäule, que es específico para grupos siringilo (Pomar y cols. 2002). Los haces vasculares se tiñeron de color marrón por la presencia de ligninas ricas en unidades de tipo G, mientras que las células de las fibras interfasciculares se tiñeron de rojo por la presencia en sus ligninas de unidades tipo S (Zhong y cols. 2000) (Figura 3.12E, F). Al igual que ocurría en la tinción con azul de toluidina, esta tinción demostró que las paredes de las células de las fibras interfasciculares son más delgadas. Además, la tinción en esta zona fue menos intensa, lo cual coincide con la disminución del ratio S/G observado en el mutante *atprx72-1* (Tabla 6).

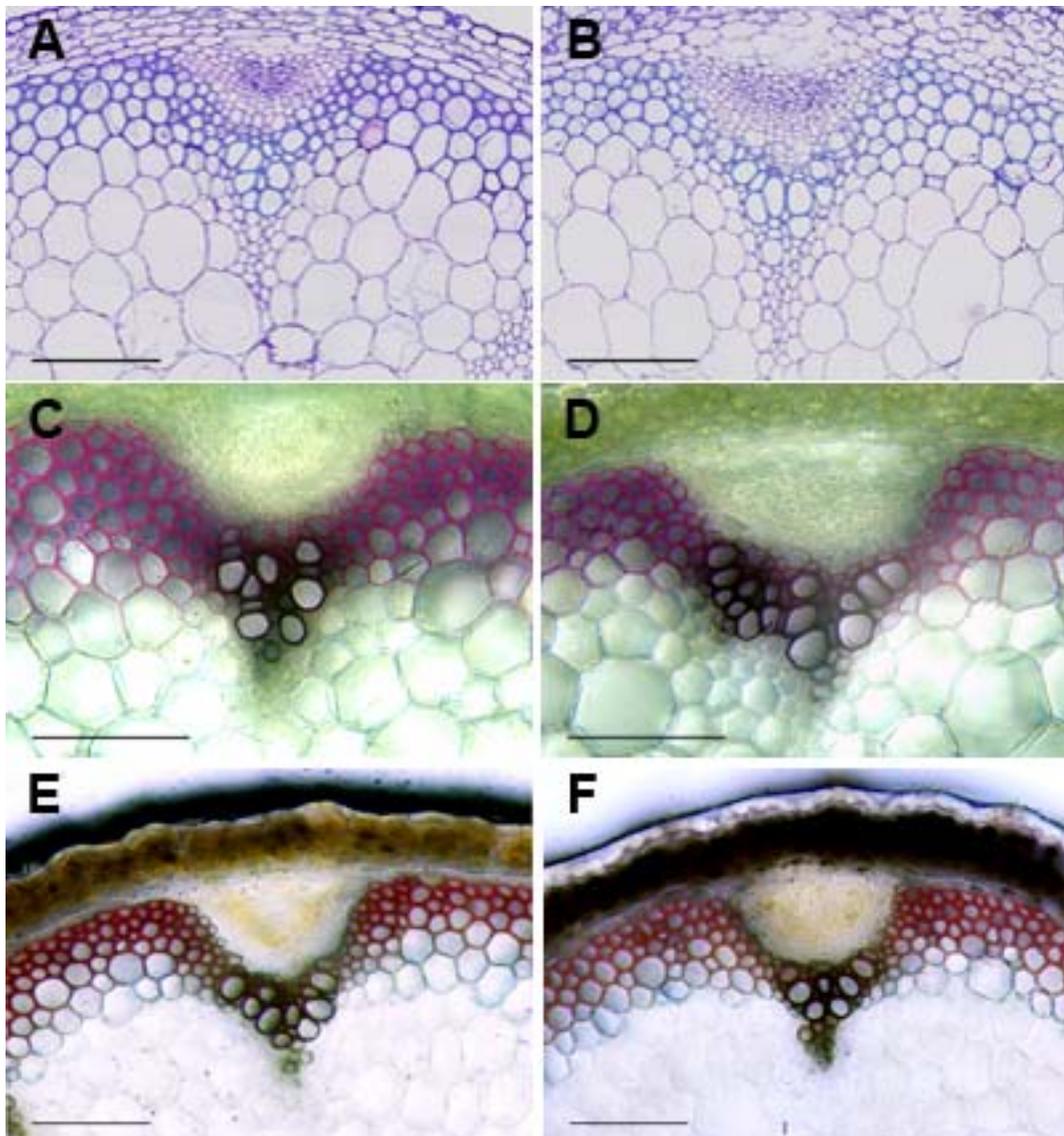


Figura 3.13. Secciones transversales de plantas WT (A, C, E) y *atprx72-2* (B, D, F) teñidas con azul de toluidina (A-B), floroglucinol (C-D) y Mäule (E-F). Barras: 100 μ m

En el caso de la línea *atprx72-2* tanto en la tinción con azul de toluidina, como en las tinciones con floroglucinol y Mäule se observaron unas paredes celulares más delgadas en las fibras interfasciculares en comparación con el WT (Figura 3.13A-D). La intensidad en la tinción con floroglucinol fue similar a la del WT, lo que indica que no hay cambios en la cantidad de lignina, dato que se había obtenido previamente mediante la cuantificación con bromuro de acetilo (Tabla 4). La tinción de Mäule reveló un comportamiento similar, lo cual indicó que no había variación en las unidades S de las ligninas de las fibras interfasciculares, observación que confirma los datos de Tabla 4.

II.5. Análisis mediante microscopía electrónica del efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx72*

Dado que los mutantes *atprx72* mostraron una disminución en la cantidad de lignina, así como alteraciones en el porcentaje de unidades siringilo y el ratio S/G se, llevó acabo un análisis de la ultraestructura de los vasos de los haces vasculares y de las fibras interfasciculares mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

La microscopía electrónica de transmisión confirmó que las alteraciones presentes en los mutantes *atprx72-1* se localizaban únicamente en las paredes celulares de las fibras interfasciculares y no en los vasos de los haces vasculares (Figura 3.14). La lámina media de las paredes de las fibras interfasciculares es mucho menos electrón-densa en comparación con el WT (Figura 3.14), lo cual podría deberse al menor grado de polimerización de las ligninas, ya que el ratio $\sum\beta\text{-O-4}/\sum\text{O-4}$ es mucho mayor en *atprx72-1* (Tabla 5), haciendo que la lignina sea menos ramificada y por lo tanto ofrezca una menor resistencia al paso de los electrones. Para *atprx72-2* no se observaron diferencias en la estructura de la pared ni en los haces ni las fibras interfasciculares, al igual que tampoco se encontraron diferencias en la estructura de la lignina revelada por tioacidolisis (Tabla 5).

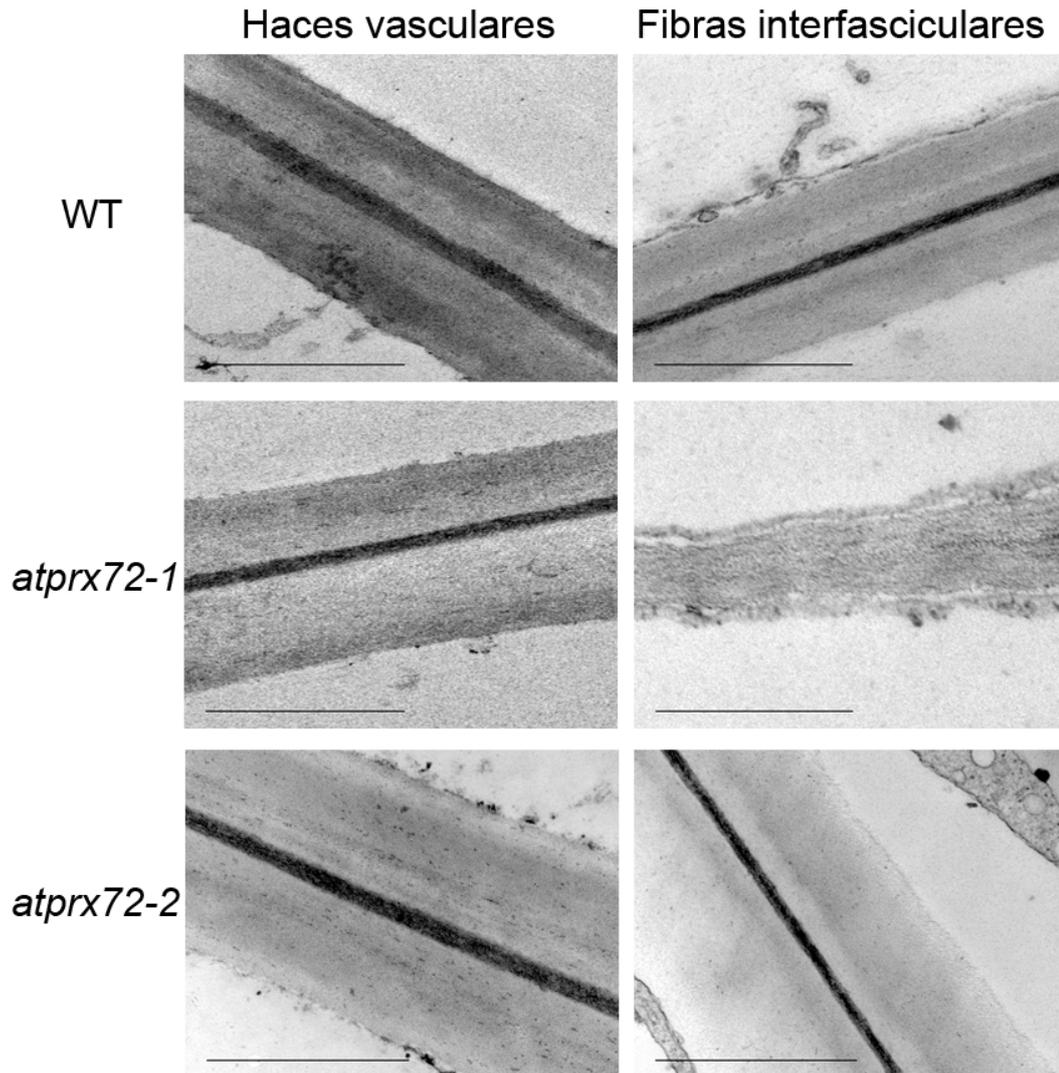


Figura 3.14. Microscopía electrónica de transmisión de las paredes celulares de los vasos y de las fibras interfasciculares de plantas maduras WT y plantas mutantes *atprx72*. Barra 1 μ m

Sin embargo, en las imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de barrido tanto *atprx71-1* como *atprx72-2* mostraron unas paredes más delgadas en las fibras interfasciculares (Figura3.15). Esta diferencia fue mayor en *atprx72-1*, lo cual confirma los datos obtenidos anteriormente, así como el menor grosor de las fibras en *atprx72-2* (Figura 3.13). Por otra parte, los haces vasculares no mostraron diferencias en ninguno de los mutantes, lo que confirma que la función de AtPrx72 parece estar restringida a las fibras interfasciculares.

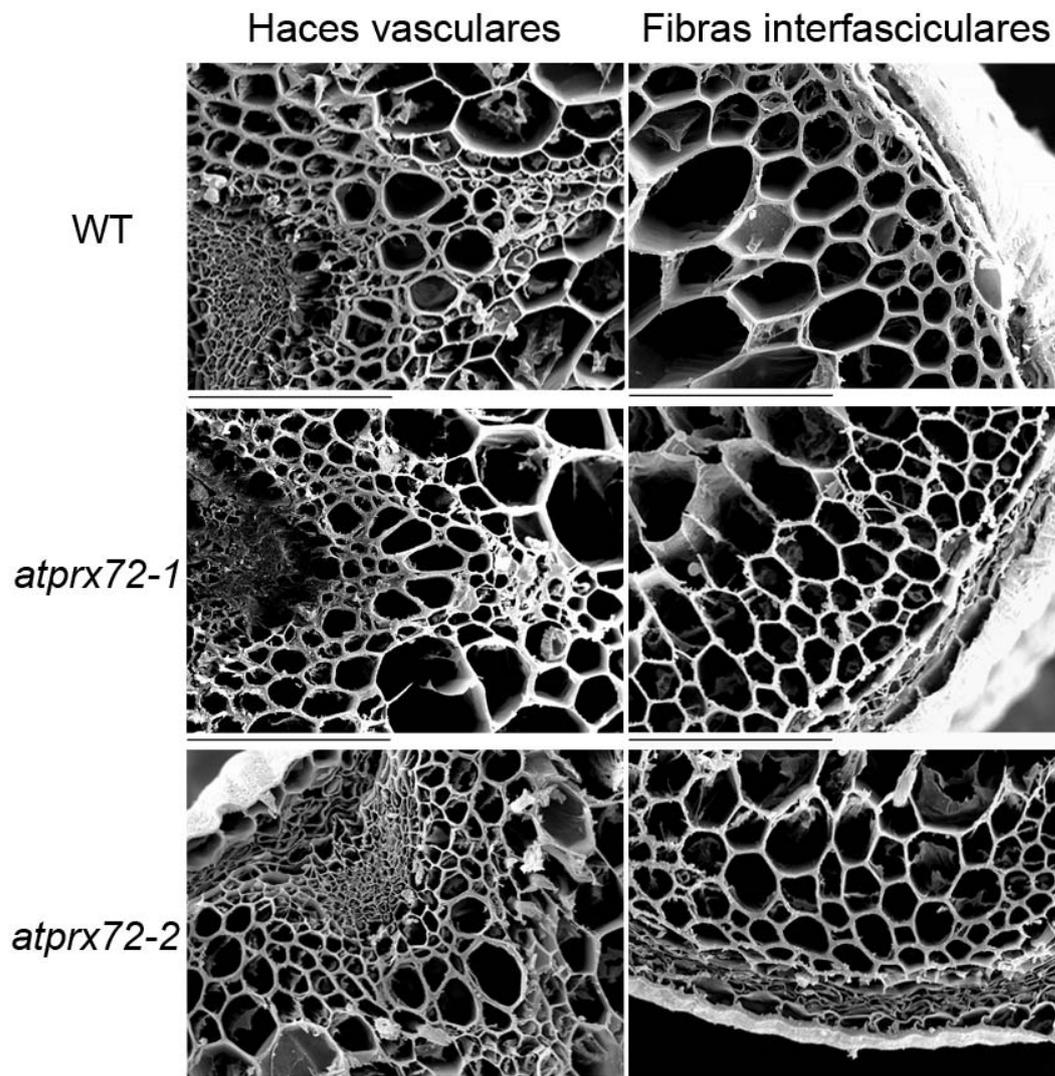


Figura 3.15. Imágenes tomadas con microscopio electrónico de barrido a partir de secciones de tallos maduros de plantas WT y mutantes. Barra 90 μ m

II.6. Efecto de la supresión de *AtPrx72* en la redistribución de esqueletos carbonados y en genes implicados en la biosíntesis de la pared celular

Para determinar si la supresión de *AtPrx72* tenía efecto sobre las demás enzimas de la ruta fenilpropanoide se analizó la expresión de algunos de los genes de estas enzimas (*PAL*, *4CL*, *CCR*, *CAD* y *F5H*). En el caso de *atprx72-1* todos los genes analizados, excepto *F5H*, mostraron una disminución de la expresión con respecto al control (Figura 3.16A). En el caso del gen *CCR* esta disminución fue mucho más acusada, lo cual es significativo dado que esta

enzima es la primera que participa en la ruta específica de la síntesis de monolignoles (Raes y cols. 2003). En el caso del mutante *atprx72-2*, los dos primeros genes de la ruta (*PAL* y *4CL*) mostraron mayor expresión que en el WT. En cambio *CCR* y *CAD*, que están involucrados directamente en la síntesis de monolignoles, presentaron una menor expresión (Figura 3.16A). Estos datos, junto con los observados en la cuantificación de ligninas (Tabla 4), la cual demostraba que la cantidad de lignina no se vio alterada en *atprx72-2*, sugiere que el flujo de esqueletos carbonados se está dirigiendo hacia otras vías del metabolismo fenilpropanoide en lugar de hacia la síntesis de ligninas. Para confirmar esta hipótesis se analizó la expresión de dos genes, *CHS* y *SMT8*, involucrados en la biosíntesis de flavonoides y ésteres sinapato, respectivamente (Figura 3.16B). En ambas líneas mutantes, *SMT8* se encuentra sobrepresado entre un 30-40% más que en el WT (Figura 3.16B), mientras que *CHS* no experimenta ningún cambio en *atprx72-1* pero su expresión fue menor en *atprx72-2*, lo que indica que los esqueletos carbonados en los mutantes se dirigen hacia la síntesis de ésteres del ácido sinápico. Esto también podría explicar el hecho de que no disminuya la expresión de *F5H*, ya que es necesaria para la síntesis de sinapaldehído, el cual es precursor de la ruta de síntesis de los ésteres del sinapato. Además, en mutantes de *AtPrx72* los procesos fotosintéticos permanecieron sin cambios, lo que sugiere que el carbono fijado durante la fotosíntesis se utilizó en otras rutas de biosíntesis (Herrero et al. 2013a).

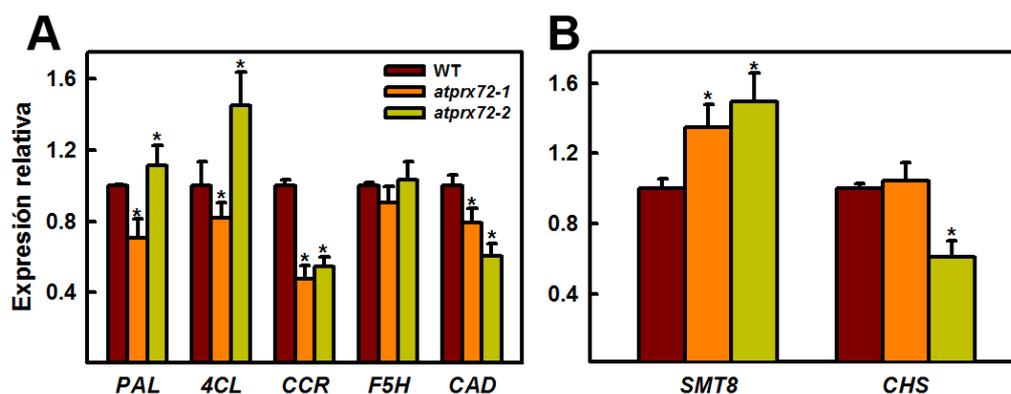


Figura 3.16. Efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx72* sobre genes implicados en la ruta de biosíntesis de las ligninas (A) y de ésteres sinapato y flavonoides (B). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. El asterisco indica diferencias significativas entre plantas WT y plantas mutantes, con un valor de $P < 0.05$.

Como se ha mencionado en el apartado de FTIR (Figura 3.10) también se observaron alteraciones en las bandas correspondientes a los hidratos de carbono de la pared. Teniendo en cuenta este resultado, se analizó la expresión de dos isoformas de la celulosa sintasa (*CesA7* y *CesA8*). En el caso de *atprx72-1* ambas isoformas presentan una reducida expresión con respecto al control. Sin embargo, *atprx72-2* únicamente presenta una menor expresión para *CesA8*, lo cual explicaría junto con la menor cantidad de lignina por qué la reducción en el grosor de las paredes celulares de las fibras interfasciculares es menor en *atprx72-2* que en *atprx72-1*. Además se analizó la expresión de *FRA8*, el cual está relacionado con la síntesis de xilanos, pero en ninguno de los mutantes aparecieron diferencias significativas con respecto al WT (Figura 3.17A).

Con el fin de conocer mejor las posibles alteraciones generadas por el bloqueo de la expresión de *AtPrx72* se analizaron diferentes factores de transcripción que están implicados en la regulación de los genes que participan en la biosíntesis de ligninas o bien de otros componentes de la pared celular. En el caso de *SND1*, es un factor de transcripción responsable del engrosamiento de las paredes celulares específicamente en las fibras interfasciculares (Zhong y cols. 2006), ambos mutantes presentan menor expresión en relación al fenotipo silvestre (Figura 3.17B). Este resultado explicaría por qué el grosor de las paredes celulares de las fibras interfasciculares es menor en ambos mutantes, ya que el bloqueo de la expresión de este factor de transcripción provoca que las fibras interfasciculares no se tiñan con floroglucinol y sus paredes celulares sean mucho más delgadas (Zhong y cols. 2007).

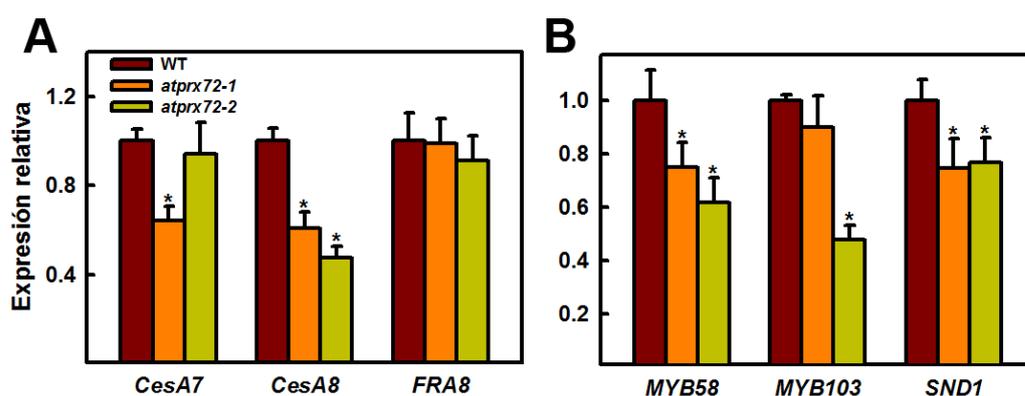


Figura 3.17. Efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx72* sobre genes implicados en la síntesis de celulosa y xilanos (A) y factores de transcripción que regulan la síntesis de la pared celular (B). En todos los casos el gen de la actina se usó como gen de referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. El asterisco indica diferencias significativas entre plantas WT y plantas mutantes, con un valor de $P < 0.05$.

MYB103 regula el engrosamiento de la pared celular secundaria a través de la deposición de celulosa y de xilanos pero no actúa sobre la síntesis o deposición de lignina (Zhong y Ye 2014), aunque recientemente se ha demostrado que regula a *F5H* (Öhman y cols. 2013) que es la única enzima de la ruta de síntesis de las ligninas que no está regulada por *MYB58*. La expresión de *MYB103* solamente se vio reducida en *atprx72-2* lo cual pone de manifiesto que el menor grosor de las fibras interfasciculares no se debe a una alteración en la deposición de lignina sino en la deposición de otros componentes de la pared celular (Figura 3.17B). *MYB58* es un factor de transcripción que regula la expresión de los genes participantes en la ruta de biosíntesis de las ligninas excepto el gen de la *F5H*, el cual no muestra elementos AC en su promotor (Zhou y cols. 2009). La expresión de este factor de transcripción fue menor en los mutantes *atprx72* que en el WT, lo cual era de esperar ya que la mayoría de los genes implicados en la síntesis de ligninas presentaron una menor expresión respecto al WT (Figura 3.16A).

**III. EFECTO DEL BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE *ATPRX52* EN
PLANTAS DE *A. THALIANA***

III.1. Localización de la inserción de T-DNA en el gen *AtPrx52* y de su expresión en diferentes órganos de *A. thaliana*

El gen que codifica para *AtPrx52* está localizado en el cromosoma 5 y al igual que las peroxidasa 4 y 72 tiene la estructura clásica de los genes de peroxidasa de clase III (Figura 3.18A). Esta proteína es una peroxidasa básica (pI teórico 8,85) y se ha descrito como una de las peroxidasa de *Arabidopsis* con mayor homología a *ZePrx* (Herrero y cols. 2013b). Esta proteína se expresa en plantas sanas, pero además su expresión se induce frente al ataque de hongos, bacterias e insectos (Little y cols. 2007, Mohr y Cahill 2007, Floerl y cols. 2012, Sela y cols. 2013).

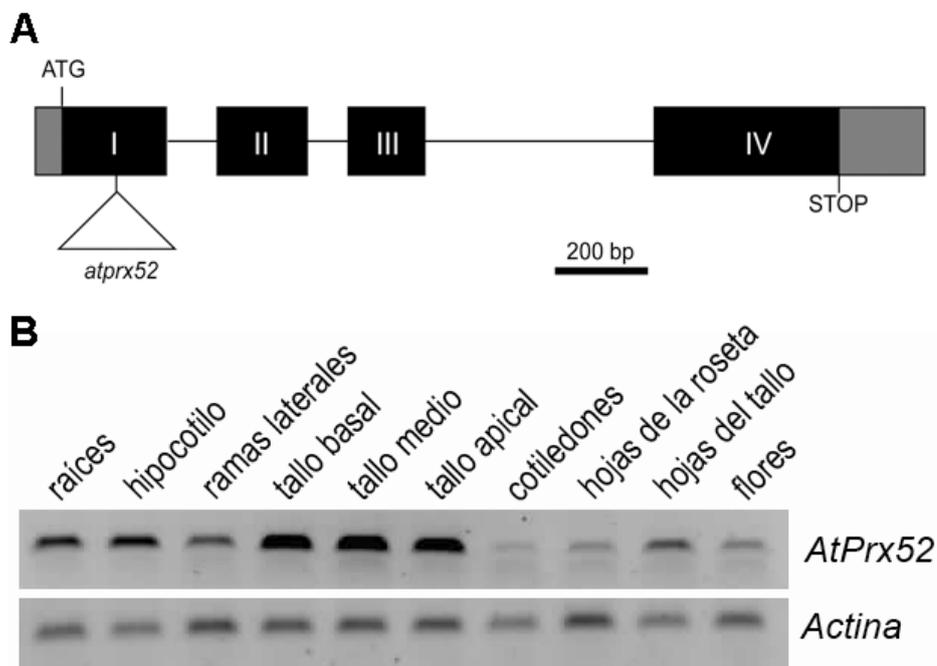


Figura 3.18. (A) Localización del inserto de T-DNA en el mutante de la peroxidasa 52. En gris se muestran los extremos 5' y 3' UTR; en negro los exones y las líneas que los conectan los intrones. (B) Localización mediante RT-PCR del transcrito correspondiente a *AtPrx52* en diferentes órganos de plantas WT de *A. thaliana*. Como gen de referencia se utilizó la actina.

Para realizar los estudios se utilizaron dos líneas mutantes para *atprx52* (At5g05340): *atprx52-1* (Salk_081257.70) y *atprx52-2* (SM_3_1699). Ambas líneas mutantes tenían una inserción en el exón 1 (antes de la histidina proximal) (Figura 18A), pero difieren en el tipo de inserción utilizado para su creación, *atprx52-1* tiene una inserción de T-DNA procedente del vector pROK2 y *atprx52-2* tiene una inserción realizada con un transposón.

AtPrx52 se expresa en diferentes partes de la planta como en raíces (Méndez-Bravo y cols. 2011), brotes (Méndez-Bravo y cols. 2011), hojas (Little y cols. 2007, Floerl y cols. 2012, Sela y cols. 2013) y estambres (Cai y Lashbrook 2008). Sin embargo, a pesar de su estrecha homología con *ZePrx*, que se expresa fuertemente en hipocotilos y epicotilos, no hay datos bibliográficos disponibles sobre la expresión *AtPrx52* en el tallo de la inflorescencia de *Arabidopsis*. Por lo tanto, para conocer la expresión de *AtPrx52* en las diferentes partes de la planta, se extrajo el RNA de diferentes órganos observándose una mayor expresión en las raíces, hipocotilos y en particular en el tallo de la inflorescencia (Figura 3.18B), siendo su expresión menor en los cotiledones, hojas tanto del tallo como de la roseta y flores (Figura 3.18B). Los resultados mostraron que *AtPrx52* se expresa diferencialmente en todos los órganos analizados y en especialmente aquellos donde la lignificación es más patente.

III.2. Efecto del noqueo de *AtPrx52* sobre el crecimiento y la composición de la pared celular de *A. thaliana*

Para determinar si el bloqueo de la expresión de *AtPrx52* afectaba al crecimiento se midió la altura del tallo y la superficie foliar de la roseta tanto en plantas WT como en plantas mutantes. En la línea *atprx52-1* la altura del tallo de la inflorescencia fue superior hasta los 32 días después de la siembra en comparación con el WT (Figura 3.19A). Este fenómeno fue observado también por Carrera y cols. (2012) utilizando un gen homólogo a *AtPrx52* en tomate, cuya represión provocó la aparición de plantas con un tamaño superior. La altura que alcanzaron las dos líneas mutantes en su etapa de madurez fue similar a la del WT. Este fenómeno suele ser habitual, ya que muchas plantas que tienen alteraciones en la ruta de biosíntesis de la lignina no muestran ninguna diferencia con respecto al WT en términos de crecimiento incluso cuando el contenido de lignina es menor en las paredes celulares de los mutantes, éstos pueden presentar patrones de crecimiento inalterados (Xu y cols. 2011, Fornalé y cols. 2012). Por otra parte, no se observaron diferencias en la superficie foliar con respecto al WT (Figura 3.19B) en ninguno de los dos mutantes.

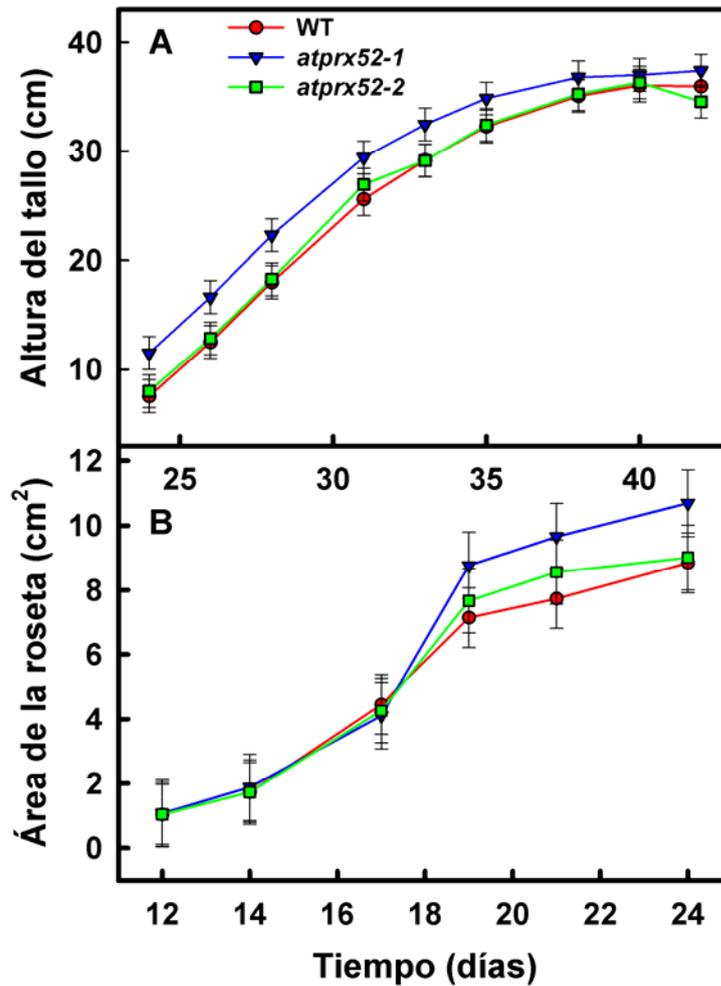


Figura 3.19. Altura del tallo principal de la inflorescencia (A) y superficie foliar de la roseta (B) de plantas WT, *atprx52-1* y *atprx52-2*.

Se realizó un análisis de la composición de las paredes celulares aisladas por medio de los espectros de FTIR en el intervalo de longitudes de onda de 800-1800 cm^{-1} (Figura 3.20). Las mayores diferencias se observaron en la región comprendida entre 1500 y 1650 cm^{-1} , que se corresponde con los compuestos con anillo fenólico y ligninas (Séné y cols. 1994, Carpita y cols. 2001). También se observó en los mutantes una disminución con respecto al control en el pico correspondiente a 1421 cm^{-1} , en el que se encuentran las uniones C–H asociadas a los grupos –O–CH₃, lo que sugiere que esta alteración podría deberse a una disminución de unidades S, tal y como ocurría en los mutantes de la peroxidasa 72. Por otra parte, se encontraron alteraciones de menor importancia en la región entre 800-1200 cm^{-1} , donde se encuentran los picos correspondientes a los hidratos de carbono (McCann y cols. 1992). Todas estas

alteraciones fueron estadísticamente significativas, a juzgar por el análisis de componentes principales (ACP) (Figura 3.20B), el cual mostró que la componente 1 explica el 46.4% de la varianza y la 2 el 36.4%. Al representar el valor de la componente 1 con respecto a los diferentes números de ondas, aquella explica el 100% de la variación correspondiente a la franja entre 1300-1650 cm^{-1} en la cual se encuentra las mayores diferencias entre mutantes y WT. (Figura 3.20D).

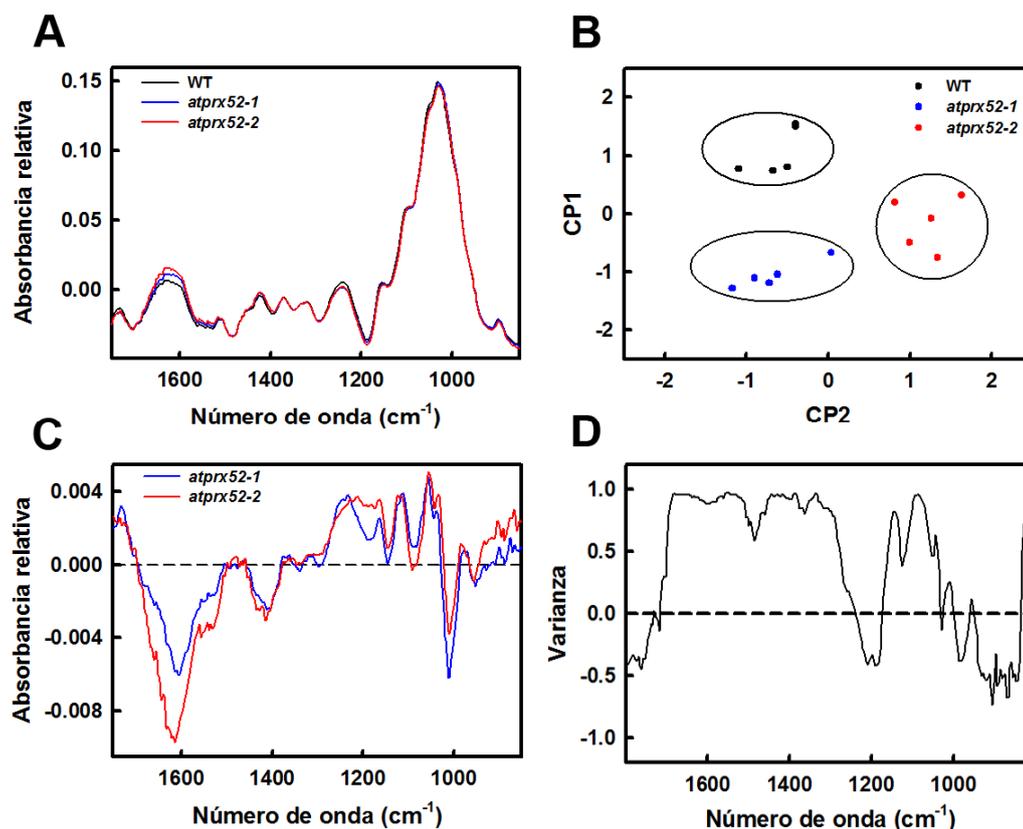


Figura 3.20. Espectros de FTIR obtenidos de las paredes celulares de WT, *atprx52-1* y *atprx52-2* (A) y la diferencia de espectros (B). La diferencia de espectros se realizó restando al espectro medio del WT, los espectros medios de los mutantes. Cada espectro medio es el resultado de la media de cinco muestras individuales. Análisis de componentes principales (ACP) (C) y explicación de la variación según la componente principal 1 (D).

III.3. Alteración del contenido y composición de ligninas por efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx52*

Por medio del método de bromuro de acetilo (Iiyama y Wallis 1988) se cuantificó el contenido de lignina en las paredes celulares del tallo de la inflorescencia, tanto en los mutantes de *AtPrx52* como en las plantas WT. El

bloqueo de la expresión de *AtPrx52* causó una disminución significativa en el contenido de lignina en *atprx52-1* (Tabla 7). La oxidación con nitrobenzono y la tioacidolisis nos permitió estudiar la composición monomérica de las ligninas. La oxidación con nitrobenzono (ONB) demostró que las ligninas en el WT estaban compuestas principalmente por unidades tipo G, como ha sido descrito anteriormente por otros autores (Rogers y cols. 2005, Sibout y cols. 2005) con un 35% de unidades S, pero no se observaron diferencias entre los mutantes y el WT (Tabla 7).

Tabla 7. Contenido y composición monomérica de las ligninas de las paredes celulares de plantas WT y mutantes *atprx52*. El contenido de ligninas se midió con el método del bromuro de acetilo y la composición monomérica se determinó mediante la oxidación con nitrobenzono (ONB) y tioacidolisis. PC: pared celular. Los asteriscos indican diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$ con respecto al WT.

	Ligninas (mg g ⁻¹ PC)	H:G:S		S/G	
		ONB	Tioacidolisis	ONB	Tioacidolisis
WT	159 ± 16	1:64:35	1:60:39	0.55	0.65
<i>atprx52-1</i>	109 ± 2*	1:64:35	1:64:35*	0.55	0.50*
<i>atprx52-2</i>	132 ± 18	1:66:33	2:66:32*	0.50	0.48*

Por otro lado, el análisis mediante tioacidolisis permite estudiar tanto la composición como la estructura del polímero de lignina ya que provoca la rotura de los enlaces β -éter y permite la solubilización del polímero (Lapierre y cols. 1995), característica que hace que este método sea el mejor para la caracterización de la lignina (Rolando y cols. 1992, Lapierre 1995). Los resultados fueron similares a los obtenidos con el nitrobenzono, aunque el porcentaje de unidades S en el WT fue mayor (Tabla 1), lo que concuerda con el hecho de que, a diferencia de la oxidación con nitrobenzono, la tioacidolisis solubiliza los enlaces no condensados (β -O-4) liberando fracciones de ligninas que son ricas en unidades S (Lapierre y cols. 1995). Se observó un aumento de la proporción de unidades G acompañado por una disminución en la proporción de unidades S tanto en *atprx52-1* como en *atprx52-2*. Esto se tradujo en una disminución de la relación S/G, de 0.7 en las plantas WT a 0.5 en las plantas mutantes para *AtPrx52*. En cuanto a la estructura de la lignina, se observó una mayor proporción en el ratio $\Sigma\beta$ -O-4 / Σ O-4 en las paredes celulares de *atprx52-2* en comparación con el WT (Tabla 8), proporcionando una estructura más lineal a la macromolécula de lignina (Durbeej y Eriksson 2003).

Tabla 8. Relación entre los distintos tipos de enlaces determinados por tioacidolisis. $\Sigma\beta$ -O-4 es el sumatorio de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter derivadas de los enlaces β -O-4, Σ O-4 representa la cantidad de enlaces O-4 terminales. El asterisco indica diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$ con respecto al WT.

	$\Sigma\beta$ -O-4	Σ O-4	$\Sigma\beta$ -O-4/ Σ O-4
WT	620.7	24.5	25.3
<i>atprx52-1</i>	410.9	18.4	22.4
<i>atprx52-2</i>	118.7	2.1	57.7*

Debido a que se observaron algunas diferencias en el crecimiento de las plantas mutantes con respecto al WT, especialmente en el mutante *atprx52-1*, se estudiaron las ligninas cualitativa y cuantitativamente en plantas jóvenes. Cuando plantas de 15 cm de altura del tallo se sometieron a tioacidolisis, los resultados mostraron pequeñas diferencias entre los mutantes y el WT (Tabla 9). En comparación con las plantas maduras, las plantas jóvenes presentaron unos tallos enriquecidos en unidades G, con una menor proporción de unidades S. Esto no es sorprendente ya que las unidades S se incorporan al polímero de lignina en las últimas etapas de la lignificación, por tanto, es coherente que las principales diferencias entre el WT y los mutantes se encuentren en plantas maduras. Del mismo modo, el contenido total de lignina se redujo de manera más acusada en plantas mutantes maduras en comparación con el WT (Tabla 9). Estos resultados demuestran que AtPrx52 participa en las últimas etapas de la lignificación, cuando el crecimiento de la planta ha finalizado.

A pesar de que las plantas WT y los mutantes mostraron resultados similares en cuanto a los parámetros de crecimiento en su etapa de madurez, las diferencias en la cantidad de lignina sólo se encontraron en esta etapa de desarrollo y no cuando las plantas presentan una altura de 15 cm. Estos resultados sugieren que AtPrx52 juega un papel importante en las últimas etapas de la lignificación, dado que los tallos jóvenes no mostraron diferencias ni en el contenido ni en la composición de ligninas en comparación con el WT. Cuando las plantas se encuentran en crecimiento, el metabolismo relacionado con este crecimiento es mayor que el de la biosíntesis de ligninas por tanto no hay efecto de la mutación sobre la planta, en cambio, cuando el crecimiento de la planta cesa (madurez), la biosíntesis de la lignina se convierte en un proceso activo y las diferencias entre WT y mutantes son más evidentes.

Tabla 9. Contenido de ligninas y composición monomérica determinada por tioacidolisis a partir de paredes procedentes de tallos de 15 cm de altura y de plantas maduras. PC: pared celular; Tr: trazas. Los asteriscos indican diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$ con respecto al WT.

	Tallos de 15 cm de altura			Plantas maduras		
	Lignina (mg g ⁻¹ PC)	H:G:S	S/G	Lignina (mg g ⁻¹ PC)	H:G:S	S/G
WT	104 ± 12	Tr:74:26	0.35	159 ± 16	1:60:39	0.65
<i>atprx52-1</i>	94 ± 6	Tr:76:24	0.32	109 ± 2	1:64:35*	0.50*
<i>atprx52-2</i>	92 ± 8	Tr:76:24	0.32	132 ± 18	2:66:32*	0.48*

El hecho de que la mayoría de los cambios fueran visibles en la madurez excluye que los cambios en la composición de los monómeros se debieran a un retraso en la lignificación. Laskar y cols. (2006) describieron que cuando se suprimió la expresión de *CCR* se detectó una reducción de la cantidad de lignina a las 6 semanas, pero no a las 9 semanas, lo que sugiere un retraso en la lignificación en las plantas mutantes. Sin embargo, los cambios ocurridos en la composición monomérica (menor ratio S/G en plantas *ccr*) se podrían asignar sólo al retraso mencionado, porque a las 9 semanas no se encontraron diferencias en las plantas *ccr* en comparación con WT. El papel de *AtPrx52* en la lignificación ha sido demostrado después del ataque de patógenos (Floerl y cols. 2012), pero en nuestro caso, la inserción de T-DNA en *AtPrx52* provocó no sólo una reducción del contenido de lignina, sino también de la relación S/G sin afectar a la viabilidad o la capacidad de crecimiento de la planta.

III.4. Efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx52* en los tejidos lignificados del tallo de *A. thaliana*

Debido al hecho de que en las angiospermas las ligninas compuestas por una mayor porcentaje de unidades S se encuentran en las fibras interfasciculares, mientras que los vasos del xilema se componen principalmente de ligninas ricas en unidades G, se realizaron análisis histoquímicos para determinar qué tejidos se veían afectados por la supresión de *AtPrx52*. La tinción con azul de toluidina reveló que las paredes celulares tanto en las fibras interfasciculares como en los haces vasculares eran ligeramente más delgadas en los mutantes que en el WT (Figura 3.21A-C).

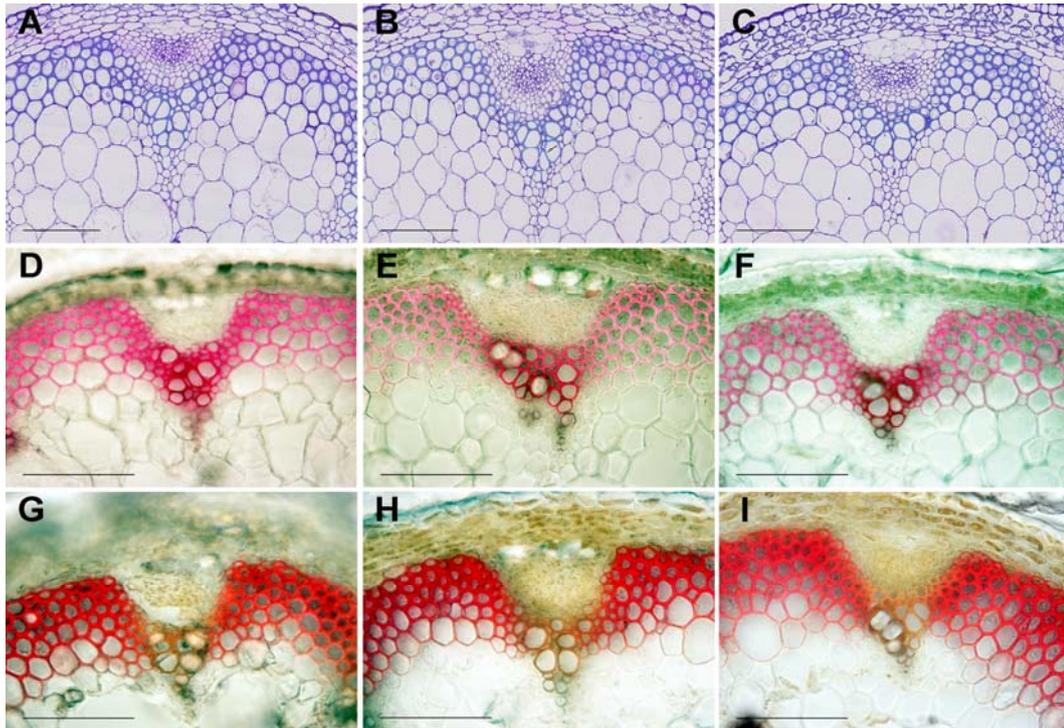


Figura 3.21. Secciones transversales de plantas WT (A, D, G), *atprx52-1* (B, E, H) y *atprx52-2* (C, F, I), teñidas con azul de toluidina (A-C), floroglucinol (D-F) y Mäule (G-I). Barras: 100 μ m.

La tinción con floroglucinol reveló que la presencia de ligninas se restringió a los haces vasculares y las fibras interfasciculares (Figura 3.21D-F), con menor intensidad de la tinción en las fibras interfasciculares de los mutantes con respecto al WT. Este dato confirma el obtenido mediante bromuro de acetilo donde la cantidad de lignina fue menor en los mutantes que en las plantas WT (Tabla 7). En los haces vasculares no se observó alteración en la tinción entre WT y los mutantes lo cual indica que AtPrx52 participa en la lignificación de las fibras interfasciculares y no en la de los haces vasculares.

Ya que AtPrx52 podría oxidar el alcohol sináplico debido a su estructura homóloga a la ZePrx (Herrero y cols. 2013b) se realizó el test de Mäule, que es específico para grupos siringilo (Pomar y cols. 2002). Los vasos del xilema se tiñeron de color marrón (Figura 3.21G-I), lo cual indica que las ligninas están formadas principalmente por unidades de tipo G, mientras que las fibras interfasciculares se tiñeron de color rojo, lo que indica la presencia de unidades tipo S, tanto en plantas WT como en mutantes (Figura 3.21G-I). Por otra parte, se detectó una disminución en la intensidad de la tinción especialmente en las fibras interfasciculares de *atprx52-2*, lo que sugiere una disminución en las

unidades de tipo S. Como se ha mencionado anteriormente, las ligninas ricas en unidades S se depositan principalmente en las fibras interfasciculares, mientras que los vasos del xilema se componen principalmente de unidades tipo G (Zhong y cols. 2000), lo que explicaría por qué los vasos del xilema se tiñeron igual en mutantes y WT, mientras que las fibras interfasciculares muestran menor intensidad cuando se tiñen con floroglucinol o con Mäule. Esta alteración específica de tejido se observó en mutantes para AtPrx72 como se mencionó en el capítulo anterior.

Un análisis detallado de la ultraestructura de las paredes de los vasos del xilema y de las fibras interfasciculares realizado con microscopía electrónica de transmisión (Figura 3.22) reveló una disminución en el grosor de las paredes celulares primarias de los mutantes. Este adelgazamiento de las paredes celulares primarias (Figura 3.23) podría explicar los resultados obtenidos en la tinción con azul de toluidina (Figura 3.21A-C).

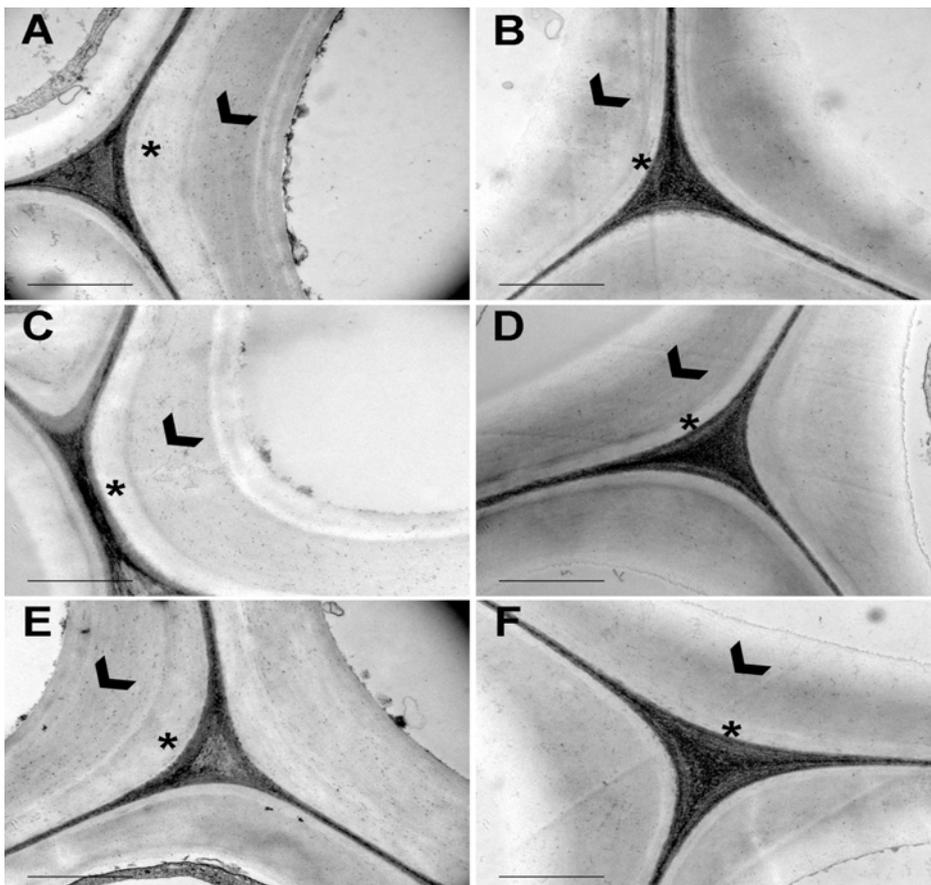


Figura 3.22. Microscopía electrónica de transmisión de las paredes celulares de los vasos (A, C, E) y de las fibras interfasciculares (B, D, F) de WT (A, B), *atprx52-1* (C, D) y *atprx52-2* (E, F). El asterisco indica la posición de la pared primaria y las flechas la localización de la pared secundaria. Barra: 1 μ m.

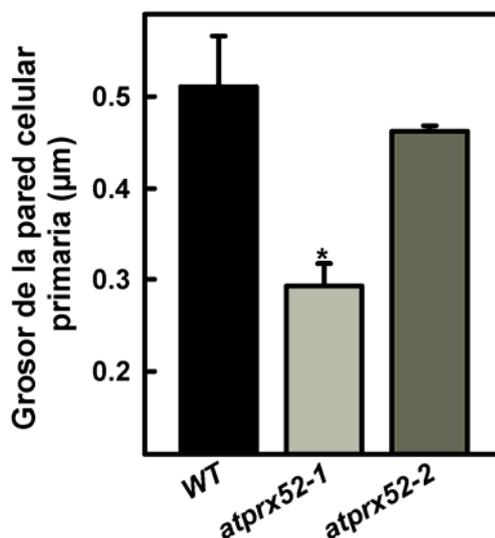


Figura 3.23. Grosor de la pared celular primaria de los vasos en los haces vasculares. El asterisco indica diferencias significativas con un valor de $P < 0.05$ con respecto al WT.

III.5. Efecto de la supresión de *AtPrx52* en la redistribución de esqueletos carbonados y en genes implicados en la síntesis de la pared celular

Con el fin de probar si la supresión de la última enzima de la ruta conduce a una represión de las enzimas que se encuentran en pasos anteriores o bien a una distribución de los compuestos intermediarios, se analizó la expresión de algunos genes implicados en la biosíntesis de la lignina, tales como *PAL*, *4CL*, *CCR*, *CAD* y *F5H*. Los resultados mostraron una disminución de la expresión de todos los genes implicados en la biosíntesis de la lignina, desde los más generales que se localizan al inicio de la ruta fenilpropanoide (*PAL*), hasta los genes específicos implicados en la biosíntesis de monómeros S (*F5H*) (Figura 3.24A). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la tabla 7, en la que se mostraba una disminución de la cantidad de lignina en las paredes celulares de los mutantes con respecto al control.

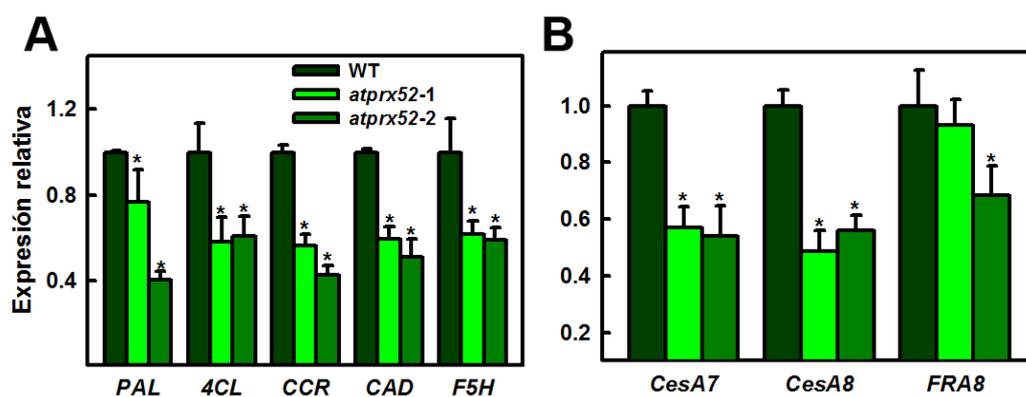


Figura 3.24. Efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx52* sobre genes implicados en la ruta de biosíntesis de las ligninas (A) y genes implicados en la síntesis de celulosa y xilanos (B). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre plantas WT y plantas mutantes, con un valor de $P < 0.05$.

El hallazgo de algunas alteraciones en los hidratos de carbono de la pared celular (Figura 3.20) nos llevó a analizar los niveles de expresión de genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria. Para ello se analizaron genes implicados en la biosíntesis de celulosa (*CesA7* y *CesA8*) y xilanos (*FRA8*). La expresión de *CesA7* y *CesA8* se vio reducida en ambos mutantes con respecto al WT y además esta reducción fue muy similar entre los mutantes (Figura 3.24B). Esto pone de manifiesto las alteraciones observadas en las bandas del espectro de FTIR asociadas a los hidratos de carbono (Figura 3.20). Estas alteraciones en los hidratos de carbono fueron similares entre ellas en ambos mutantes, al igual que el patrón de expresión observado mediante qRT-PCR

Con el fin de descifrar si otras rutas del metabolismo fenilpropanoide se encontraban alteradas como consecuencia de la menor expresión de los genes implicados en la biosíntesis de ligninas, se analizaron los niveles de expresión de *CHS*, implicada en la biosíntesis de flavonoides, y *SMT8*, que participa en la formación de ésteres sinapato. Se sabe que la supresión de genes implicados en la biosíntesis de ligninas puede afectar al flujo de compuestos intermedios hacia otras vías que están interconectadas con aquella (Besseau y cols. 2007). En ambos mutantes *atprx52*, *CHS* y *SMT8* presentaron una expresión mayor que la encontrada en el WT para esos mismos genes (Figura 3.25A). Por tanto, la supresión de una sola peroxidasa conduce a una disminución de la expresión de los principales genes de la ruta de biosíntesis de las ligninas, además de provocar

un redireccionamiento de los intermediarios de la ruta hacia otras vías, como son la biosíntesis de flavonoides y de ésteres de sinapato.

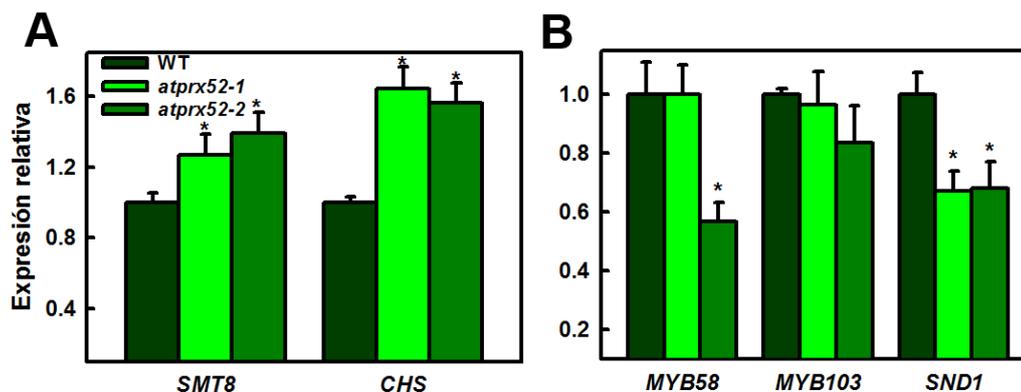


Figura 3.25. Efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx52* sobre genes implicados en la ruta de biosíntesis de ésteres sinapato y flavonoides (A) y factores de transcripción que regulan la síntesis de la pared celular (B). En todos los casos el gen de la actina se usó como gen de referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre plantas WT y plantas mutantes, con un valor de $P < 0.05$.

Por otra parte, se analizó la expresión de los factores de transcripción *SND1*, *MYB58* y *MYB103*. Únicamente se observó una disminución de la expresión de *MYB58* en *atprx52-2*, el cual regula directamente la expresión de los genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de ligninas (Zhou y cols. 2009). En ambos mutantes la expresión de *SND1* (Figura 3.25B), que regula el engrosamiento de la pared celular secundaria específicamente en las fibras interfasciculares (Zhong y cols. 2006), fue menor con respecto al control. Estos resultados están de acuerdo con la menor tinción observada en las fibras interfasciculares de los mutantes con respecto al control (Figura 3.21 D-F)

Por otra parte, dado que en el capítulo anterior hemos demostrado la implicación de *AtPrx4* y *AtPrx72* en la lignificación, se estudió la expresión de estas dos peroxidasas en los mutantes de *AtPrx52*. Los resultados mostraron que la expresión de *AtPrx4* y *AtPrx72* no varió en ambos mutantes con respecto al WT (Figura 3.26). Podemos confirmar entonces que el efecto de las alteraciones presentes en los mutantes se debe al bloqueo de la expresión de la peroxidasa 52 y no a la reducción de las otras dos peroxidasas.

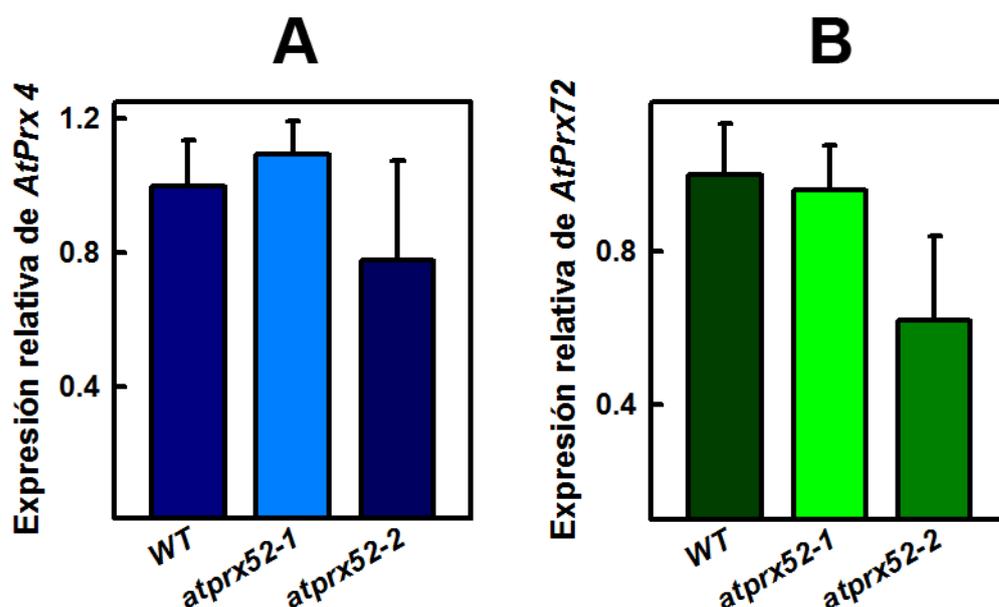


Figura 3.26. Efecto del bloqueo de la expresión de *AtPrx52* sobre la expresión de las peroxidasa 4 (A) y 72 (B). En todos los casos el gen de la actina se usó como gen de referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

Aunque los datos señalan la participación de estas tres peroxidasa (4, 52 y 72) en la formación de unidades S en las fibras interfasciculares de *Arabidopsis*, es poco probable que sean las únicas responsables de la oxidación del alcohol sinapílico. Esta redundancia en la función no debería sorprender en una especie cuyo genoma codifica para 73 peroxidasa. De hecho, es bastante común que *Arabidopsis* tenga varias isoenzimas que participen en diferentes pasos de la ruta de biosíntesis de la lignina (Vanholme y cols. 2012) lo cual no es de extrañar teniendo en cuenta que la lignificación tiene un papel fundamental para la supervivencia de la planta y sus interacciones con el entorno.

La implicación de varias isoenzimas en el mismo proceso catalítico permite que este se lleve a cabo incluso cuando una de estas isoenzimas no es funcional o está ausente. Teniendo en cuenta este razonamiento lo más probable sería la existencia de una gran cantidad de isoenzimas de peroxidasa con la capacidad de oxidar el alcohol sinapílico y que cada una contribuyese a la biosíntesis de ligninas ricas en unidades S.

El conocer la síntesis del polímero de lignina y concretamente la incorporación de unidades ese S despierta el interés de numerosos investigadores. Shigeto y cols. (2013) identificaron tres peroxidasa catiónicas

(2, 25 y 71) con gran homología a la peroxidasa de álamo CWPO-C, la cual prefiere como sustrato el alcohol sinapílico antes que el coniferílico (Sasaki y cols. 2004). Mutantes *knock-out* de estas tres peroxidases mostraron una disminución en el contenido de lignina, y aunque la relación S/G no era menor en los mutantes que en las plantas WT (Shigeto y cols. 2013), proteínas recombinantes de AtPrx2 y AtPrx71 fueron capaces de oxidar la siringaldazina (un análogo químico del alcohol sinapílico) de manera más eficiente que el guaiacol (Shigeto y cols. 2014). Todos estos datos nos obligan a considerar que el estudio de peroxidases siringilo en *Arabidopsis* debe abordarse con estudios más complejos que permitan la obtención de fenotipos mutantes con una gran reducción de unidades S.

El conocimiento generado permitiría conocer mejor la biosíntesis de las ligninas y así obtener plantas con una pared reducida en ligninas que permitiese la utilización de dichas plantas en fines industriales.

Conclusiones

1.- La expresión de *AtPrx72* y *AtPrx52* se localizó en raíces, hipocotilos y tallo de la inflorescencia, mientras que sus expresiones relativas en hojas fueron muy bajas. En cambio, la expresión de *AtPrx4* se localizó en raíces, hipocotilos, tallo de la inflorescencia, cotiledones, hojas y flores. La expresión de las tres peroxidases en el tallo de la inflorescencia e hipocotilos apoya la participación de dichas peroxidases en la lignificación de las paredes celulares.

2.- La supresión de la expresión de las peroxidases 4 y 52 no afecta a la viabilidad ni al crecimiento de las plantas, en términos de altura de la inflorescencia y área foliar. Sin embargo, el mutante *atprx72* mostró una disminución en la altura del tallo, así como una reducción del área de la roseta en comparación con las plantas WT.

3.- El análisis por FTIR de las paredes celulares mostró alteraciones en la composición de la pared a nivel de los hidratos de carbono ($800-1200\text{ cm}^{-1}$) y de las ligninas ($1400-1600\text{ cm}^{-1}$) para los mutantes *atprx4* y *atprx72*. En el caso de los mutantes *atprx52* las alteraciones se observaron principalmente en la zona de las ligninas ($1400-1600\text{ cm}^{-1}$)

4.- La supresión de *AtPrx4*, *AtPrx52* y *AtPrx72* provocó una disminución en el contenido de lignina en los mutantes de estas peroxidases. Además, la proporción de unidades S fue menor en las plantas mutantes que en las WT. Esta reducción se tradujo en una disminución del ratio S/G con respecto al WT, así como un aumento del ratio $\Sigma \beta\text{-O-4}/\Sigma \text{O-4}$ (en *atprx52* y *atprx72*) lo cual supone una estructura más lineal del polímero de lignina. En el caso de la supresión de *AtPrx4* la reducción del contenido de lignina y del ratio S/G solamente se produjo en plantas crecidas bajo fotoperiodo de día largo, pero no en aquellas cultivadas con fotoperiodo de día corto. En todos los casos se observó que la disminución en el contenido de lignina y el ratio S/G depende de la edad de la planta, puesto que sólo fue significativa en aquellos estadíos en los que predomina la lignificación sobre el crecimiento, lo cual está relacionado con la deposición tardía de las unidades S en el polímero de lignina.

5.- La disminución en la proporción de las unidades S en *atprx4*, *atprx52* y *atprx72* se restringe a las fibras interfasciculares, como se deduce de las tinciones de Maüle y Wiesner. Además, el mutante *atprx72* mostró una alteración en la estructura vascular, puesto que se observó un colapso de algunos vasos, así como la ausencia de lámina media.

7.- El bloqueo de la expresión de cada uno de los genes de peroxidasa fue suficiente para causar una disminución de la expresión de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de las ligninas (*PAL*, *4CL*, *CCR*, *F5H* y *CAD*), así como de otros genes relacionados con la formación de la pared secundaria, como la síntesis de celulosa y xilanos. También se redujo la expresión génica del factor de transcripción *SND1*, encargado de regular la lignificación específicamente en las fibras interfasciculares y actuar directamente sobre el promotor de *F5H*.

8.- La expresión de *SMT8* (relacionada con la formación de ésteres de sinapato) y *CHS* (implicada en la síntesis de flavonoides) se incrementó en los mutantes de la peroxidasa *AtPrx52*, mientras que la supresión de *AtPrx4* y *AtPrx72* causó un aumento de la expresión de *SMT8*. La alteración de la expresión de estos genes indica una redistribución de esqueletos carbonados hacia otras rutas del metabolismo fenilpropanoide, como son las rutas de biosíntesis de ésteres de sinapato y flavonoides.

Bibliografía

- Abeles FB y Biles CL.** 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol* 95: 269-273.
- Alejandro S, Lee Y, Tohge T, Sudre D, Osorio S, Park J, Bovet L, Lee Y, Geldner N, Fernie AR y Martinoia E.** 2012. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr. Biol.* 22: 1207-1212.
- Allison SD y Schultz JC.** 2004. Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *J Chem Ecol* 30: 1363–1379.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A y Pedreño MA.** 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot.* 60: 377–390.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Henonin LA, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC y Ecker JR.** 2003 Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 301: 653-657.
- Anterola A y Lewis NG.** 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221-294.
- Anterola AM, Jeon JH, Davin LB y Lewis NG.** 2002. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. *J Biol Chem* 277: 18272-18280.
- Aoyama W, Sasaki S, Matsumura S, Mitsunaga T, Hirai H, Tsutsumi Y and Nishida T.** 2002 Sinapyl alcohol-specific peroxidase isoenzyme catalyzes the formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol. *J Wood Sci* 48: 497–504.
- Armengaud P, Breitling R, Amtmann A.** 2004. The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiol.* 136:2556–76
- Atanassova R, Favet N, Martz F, Chabbert B, Tollier MT, Monties B, Fritig B y Legrand M.** 1995. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O - methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J.* 8: 465-477
- Baier M, Goldberg R, Catesson AM, Francesch C y Rolando C.** 1993. Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochemistry* 32: 789-793.
- Bakardjieva NT, Christova N y Christov K.** 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitive of peroxidase from mosses (*Mnium sp.*) and ferns (*Polypodium vulgare*) to high temperature. *Can J Bot* 74: 1665-1670.
- Banci L.** 1997. Structural properties of peroxidase. *J Biotechnol* 53: 253-263.

- Bao W, O'Maley DM, Whetten R y Sederoff RR.** 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260: 672-674.
- Bell-Lelong DA, Cusumano JC, Meyer K y Chapple C.** 1997. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*: regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol* 113: 729-738.
- Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A y Plourde GL.** 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol* 121: 135-145.
- Berthet S, Demont-Caulet N, Pollet B, Bidzinski P, Cézard L, Le Bris P, Borrega N, Herve J, Blondet E, Balzergue S, Lapierre C y Jouanin L.** 2011. Disruption of LACCASE4 and 17 result in tissue-specific alteration to lignification os *Arabidopsis thaliana* stems. *The Plant Cell*. 23: 1124-1137.
- Berthet S, Thevenin T, Baratiny D, Demont-Caulet N, Debeaujon I, Bidzinski P, Lepié JC, Huis R, Hawkins S, Gomez LD, Lapierre C y Jouanin L.** 2012. Role of laccases in ligni polymerization. In: Lapierre C, Joannin L, eds. *Advances in botanical research. Lignins: biosynthesis, biodegradation and bioengineering*. London: Elsevier, 145-172.
- Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B y Legrand M.** 2007. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*. 19: 148-162
- Bethke PC y Jones RL.** 2001. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *The Plant Journal* 25: 19-29.
- Bhargava A, Mansfield SD, Hall HC, Douglas CJ and Ellis BE.** 2010. MYB75 functions in regulation of secondary cell wall formation in the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant. Physiol*. 154: 1428-1438.
- Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies DR, Ausubel FM and Bolwell GP.** 2006. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant. J*. 47: 851-863.
- Blee KA, Jupe SC, Richard G, Zimmerlin A, Davies DR y Bolwell P.** 2001. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol Biol* 47: 607-620.
- Boerjan W, Ralph J y Baucher M.** 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol* 54: 519-546.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C and Minibayeva F.** 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Expl Bot* 53: 1367-1376.
- Bonawitz ND, Chapple C.** 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotypeto phenotype. *Annu Rev Genet*. 44:337-63

- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis, KR y Görlach J.** 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis* a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* . 13: 1499-1510.
- Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R y Turner SR.** 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17: 2281-2295.
- Brunow G, Kilpelainen I, Sipila J, Syrjanen K, Karhunen P, Setala H y Rummakko P.** 1998. Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin. In: Lewis NG, Sarkene S. (Eds). *Lignin and lignan Biosynthesis*. American Chemical Society, Washington DC, pp. 131-147.
- Buchanan BB, Grissem W y Jones RL.** 2000. *Biochemistry & Molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Monona Drive, Rockville USA.
- Burmeister G y Hosel W.** 1981. Immunohistochemical localization of beta-glucosidase in lignin and isoflavone metabolism in *Cicer arietinum*. *Planta*. 152; 578-586.
- Cai S y Lashbrook CC.** 2008. Stamen abscission zone transcriptome profiling reveals new candidates for abscission control: enhanced retention of floral organs in transgenic plants overexpressing *Arabidopsis* ZINC FINGER PROTEIN2. *Plant Physiol* 146: 1305-1321.
- Caliskan M y Cuming AC.** 1998. Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination. *Plant J* 15: 165-171.
- Carpin S, Crèvecoeur M, Greppin H y Penel C.** 1999. Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in Zucchini. *Plant Physiol* 120: 799-810.
- Carpita NC y Gibeaut DM.** 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3: 1-30.
- Carpita NC, Defernez M, Findlay K, Wells B, Shoue DA, Catchpole G, Wilson RH y McCann MC.** 2001. Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol*. 127: 551-565.
- Carpita NC.** 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476.
- Carrera E, Ruiz-Rivero O, Peres LE, Atares y Garcia-Martinez JL.** 2012. Characterization of the procerato tomato mutant shows novel functions of the SIDELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiol* 160: 1581-1596.
- Cassab GI y Varner JE.** 1988. Cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol* 39: 321-353.

- Cassan-Wang H, Goué N, Saidi MN, Legay S, Sivadon P, Goffner D, y Grima-Pettenati J.** 2013. Identification of novel transcription factors regulating secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*. 4: 189-203
- Chabannes M, Ruel K, Chabbert B, Jauneau A, Joseleau JP y Boudet AM.** 2001. In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J* 28: 271-282.
- Chapelle A, Morreel K, Vanholme R, Le-Bris P, Morin H, Lapierre C, Boerjan W, Jouanin L y Demont-Caulet N.** 2012. Impact of the absence of stem-specific beta-glucosidases on lignin and monolignols. *Plant Physiol* 160: 1204-1217.
- Chapple CCS, Vogt T, Ellis BE y Somerville CR.** 1992. An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4: 1413-1424.
- Chibbar RN, Cella R y van Huystee RB.** 1984. The heme moiety in peroxidase. *Can J Biochem Cell Biol* 62: 1046-1050.
- Chomczynski P.** 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15: 532-4.
- Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Montagu MV y Boerjan W.** 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol* 118: 125-135.
- Christensen JH, Overney S, Rohde A, Diaz WA, Bauw G, Simon P, Van Montagu M y Boerjan W.** 2001. The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant Mol Biol* 47: 581-593.
- Collen J, Ekdahl A, Abrahamsson K y Pedersen M.** 1994. The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristrella gelidium*. *Phytochemistry* 36: 1197-1202.
- Converso DA y Fernández ME.** 1996. Ca²⁺ activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control. *Arch Biochem Biophys* 333: 59-65.
- Cosgrove DJ.** 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 171-201.
- Cosio C y Dunand C.** 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J Exp Bot.* 60: 391-408.
- Cosio C, Vuillemin L, De Meyer M, Kevers C, Penel C y Dunand C.** 2008. An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation thanks to its auxin oxidase activity. *Planta*. 229: 823-836.
- Daudi A, Cheng Z, O'Brien JA, Mammarella N, Khan S, Ausubel F y Bolwell GP.** 2012. The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a

- major component of pattern-triggered immunity. *The Plant Cell* 24: 275-287.
- Davin LB, Jourdes M, Patten AM, Kim KW, Vassao DG y Lewis NG.** 2008. Dissection of lignin macromolecular configuration and assembly: comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis. *Nat. Prod. Rep* 25: 1015-1090.
- Dean JFD y Eriksson KEL.** 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48: 21-33.
- Demon-Caulet N, Lapierre C, Jouanin L, Baumberger S y Méchin V.** 2010. Arabidopsis peroxidase-catalyzed copolymerization of coniferyl and sinapyl alcohols: kinetics of an andwise process. *Phytochem.* 71: 1673-1683.
- Dharmawardhana DP, Ellis BE y Carlson JE.** 1995. A β -glucosidase from logdepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol* 107: 331-339.
- Donaldson LA.** 2001. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57: 859-873.
- Duarte-Vázquez MA, García-Almendárez BE, Rojo-Domínguez A, Whitaker JR, Arroyave-Hernández C y Regalado C.** 2003. Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isoenzyme. *Phytochemistry* 62: 5-11.
- Dunand C, de Meyer M, Crévecoeur M y Penel C.** 2003. Expression of a peroxidase gene in zucchini in relation with hypocotyl growth. *Plant Physiology and Biochemistry.* 41: 805–811.
- Durbeej B y Eriksson LA.** 2003. Formation of β -O-4 lignin models - a theoretical study. *Holzforschung.* 57: 466-478
- Edwards K, Johnstone C y Thompson C.** 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids res.* 19: 1349.
- Escamilla-Treviño LL, Chen W, Card ML, Shih MC, Cheng CL y Poulton JE.** 2006. Arabidopsis thaliana β -glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. *Phytochem.* 67: 1651_1660.
- Fagerstedt KV, Kukkola EM, Koistinen VT, Takahashi J y Marjamaa K.** 2010. Cell Wall Lignin is Polymerised by Class III Secretable Plant Peroxidases in Norway Spruce. *J Integr Plant Biol.* 52: 186-194
- Faix O, Bremer J, Schmidt O y Stevanovic J.** 1991 Monitoring of chemical changes in white-rot degraded beech wood by pyrolysis-gas chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy. *J Anal Appl Pyrolysis* 21:147–162.
- Faix O.** 1991 Classification of lignins from different botanical origins by FTIR spectroscopy. *Holzforschung* 45:21–27.
- Ferrer E, Santoni E, Vittori S, Font G, Mañes J y Sagratini G.** 2011. Simultaneous determination of bisphenol A, octylphenol, and nonylphenol

- by pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas. *Food Chem.* 126: 360-367.
- Ferrer MA, Pedreño MA, Muñoz R y Ros Barceló A.** 1990. Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O₂. A model for the lignification of plant cell walls in the absence of H₂O₂. *FEBS Lett* 276: 127-130.
- Fincher GB.** 2009. Exploring the evolution of (1,3;1,4)-beta-D-glucans in plant cell wall: comparative genomics can help!. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12; 140-147.
- Floerl S, Majcherczyk A, Possienke M, Feussner K, Tappe H, Gatz C, Feussner I, Kües U y Polle A.** 2012. *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 7:e31435
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torresk MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jonesk JDG, Davies JM y Dolan L.** 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 422: 442–446.
- Fornalé S, Capellades M, Encina A, Wang K, Irar S, Lapierre C, Ruel K, Joseleau JP, Berenguer J, Puigdomènech P, Rigau J y Caparrós-Ruiz D.** 2012. Altered lignin biosynthesis improves cellulosic bioethanol production in transgenic maize plants down-regulated for cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Mol Plant.* 5: 817-830.
- Foyer CH y Noctor G.** 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment.* 28: 1056–1071.
- Fraser MC y Chapple C.** 2011. The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis book.*
- Freudenberg K, Hen CL, Harkin JM, Nimz H y Renner H.** 1965. Observations on lignin. *Chem Commun.* 224-225.
- Fry SC.** 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 497-520.
- Fukuda H.** 1992. Tracheary element formation as a model of cell differentiation. *Int Rev Cytol* 136: 289-332.
- Fukuda H.** 1996. Xylogenesis: Initiation, progression and cell death. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 299-325.
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2005. Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol* 139: 1138-1154.
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Merino F, Cuello J, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2006. Characterization of the last step of lignin

- biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. FEBS Lett. 580:4311-4316.
- Gómez-Ros LV, Gabaldón C, López Núñez-Flores MJ, Gutiérrez J, Herrero J, Zapata JM, Sottomayor M, Cuello J y Ros Barceló A.** 2012. The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains *cis*-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide. *Planta*. 236: 327–342.
- Gómez-Ros LV, Gabaldón C, Pomar F, Merino F, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2007. Structural motifs of syringyl peroxidases pre-date not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. *New Phytol* 173: 63-78.
- Grabber JH, Hatfield RD y Ralph J.** 2003. Apoplastic pH and monolignol addition rate effects on lignin formation and cell wall degradability in maize. *J Agric Food Chem* 51: 4984–4989.
- Gray JSS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP y Montgomery R.** 1996. The glycans of soybean peroxidase. *Glycobiology* 6: 23-32.
- Grisebach H.** 1981. Lignins. En “The Biochemistry of plants. A comprehensive treatise” (Conn EE, ed) Academic Press
- Guan Y y Nothnagel EA.** 2004. Binding of arabinogalactan proteins by Yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiol*. 135: 1346-1366.
- Gutiérrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, Del Río JC y Martínez AT.** 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environ Sci Technol* 41: 4124-4129.
- Gutiérrez J, López Núñez-Flores MJ, Gómez-Ros LV, Novo- Uzal E, Esteban Carrasco A, Díaz J, Sottomayor M, Cuello J y Ros Barceló A.** 2009. Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Planta*. 230: 767–778.
- Hahlbrock K y Scheel D.** 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 347-369.
- Harholt J, Suttangkakul A and Scheller HV.** 2010. Biosynthesis of pectins. *Plant Physiol*. 153: 384–39.
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC y Cottage A.** 2006. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*. 2:19-26
- Hatfield RD y Vermerris W.** 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol* 126: 1351–1357.
- Hazlewood GP y Gilbert HJ.** 1998. Structure and function analysis of *Pseudomonas* plant cell wall hydrolases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 211-241.

- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ y Chapple C.** 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 38: 765-78.
- Herrero J, Esteban-Carrasco A y Zapata JM.** 2013b. Looking for *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol Biochem.* 67: 77-86.
- Herrero J, Esteban-Carrasco A y Zapata JM.** 2014. *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis: In silico promoter analysis and hormonal regulation. *Plant Physiol Biochem.* 80: 192-202
- Herrero J, Fernández-Pérez F, Yebra T, Novo-Uzal E, Pomar F, Pedreño M, Cuello J, Guéra A, Esteban-Carrasco A y Zapata JM.** 2013a. Bioinformatic and functional characterization of the basic peroxidase 72 from *Arabidopsis thaliana* involved in lignin biosynthesis. *Planta.* 237: 1599–1612.
- Higuchi T.** 1985. Biosynthesis of lignin. En “Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components” (Higuchi T, ed) pp 141-160, New York, Academic Press.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y y Matsui H.** 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42:462-468.
- Holm KB, Andreassen PH, Eckloff MG, Kristensen BK y Rasmussen SK.** 2003. Three differentially expressed basic peroxidases from wound-lignifying *Asparagus officinalis*. *J Exp Bot* 54: 2275-2284.
- Iiyama K y Wallis AFA.** 1988. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci Technol.* 22: 271-280.
- Iori R, Cavalieri B y Palmieri S.** 1995. Cathodic peroxidases of durum wheat flour. *Cereal Chem* 72: 176-181.
- Irshad M, Canut H, Borderies G, Pont-Lezica R y Jamet E.** 2008. A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol.* 8:94.
- Jespersen HM, Kjaersgard IV, Østergaard L y Welinder KG.** 1997. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem J* 326: 305-310.
- Jin J, Hewezi T y Baum TJ.** 2011. *Arabidopsis* peroxidase AtPRX53 influences cell elongation and susceptibility to *Heterodera schachtii*. *Plant Signal. Behav.* 6: 1778–1786.
- Joseleau JP, Imai T, Kuroda K y Ruel K.** 2004. Detection in situ and characterization of lignin in the G-layer of tension wood fibres of *Populus deltoides*. *Planta* 219: 338–345.
- Kaneda M, Rensing KH, Wong JC, Banno B, Mansfield SD y Samuels AL.** 2008. Tracking monolignols during wood development in lodgepole pine. *Plant Physiol.* 147: 1750-1760.

- Kaneda M, Schuetz M, Lin BSP, Chanis C, Hamberger B, Western TL, Ehlting J y Samuels AL.** 2011. ABC transporter coordinately expressed during lignification of Arabidopsis stem includes a set of ABCBs associated with auxin transport. *J. Exp. Bot.* 62: 2063-2077.
- Kaneda M, Schuetz M, Lin BSP, Chanis C, Hamberger B, Western TL, Ehlting J y Samuels AL.** 2011. ABC transporters coordinately expressed during lignification of Arabidopsis stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J Exp Bot.* 1-15
- Kang JG, Pyo YJ, Cho JW y Cho MH.** 2004. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by K⁺ deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics.* 4: 3549–3559.
- Kärkönen A, Koutaniemi S, Mustonen M, Syrjänen K, Brunow G, Kilpeläinen I, Teeri TH y Simola LK.** 2002. Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. *Physiol Plant* 114: 343-353.
- Kawano T.** 2003 Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep.* 21: 829–837.
- Kawaoka A, Kaothien P, Yoshida K, Endo S, Yamada K y Ebinuma H.** 2000. Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J* 26: 289-301.
- Kim HJ, Kato N, Kim S y Triplett B.** 2008. Cu/Zn superoxide dismutases in developing cotton fibers: evidence for an extracellular form. *Planta.* 228: 281-292
- Kim WC, Kim JY, Ko JH, Kang H y Han KH.** 2014. Identification of direct targets of transcription factor MYB46 provides insights into the transcriptional regulation of secondary wall biosynthesis. *Plant Mol Biol.* 85: 589–599.
- Kim YH, Kim CH, Song WK, Park DS, Kwon SY, Lee HS, Bang JW y Kwak SS.** 2008. Overexpression of sweetpotato SWPA4 peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. *Planta.* 227: 867-881.
- Klok EJ, Wilson IW, Wilson D, Chapman SC, Ewing RM, Somerville SC, Peacock WJ, Dolferus R y Dennis ES.** 2002. Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures. *Plant Cell.* 14: 2481–2494.
- Kobayashi T, Taguchi H, Shigematsu M y Tanahashi M.** 2005. Substituent effects of 3,5-disubstituted *p*-coumaryl alcohols on their oxidation using horseradish peroxidase-H₂O₂ as the oxidant. *J Wood Sci* 51: 607-614.
- Kozela C y Regan S.** 2003. How plants make tubes. *Trends Plant Sci* 8: 159-164.
- Kretschmann D.** 2003. The remarkable deformability of wood in a moist environment resembles that of ductile metals. A combination of traditional mechanical tests and cutting-edge diffraction experiments reveal the

- molecular mechanism that determines such behaviour. *Nat Mat* 2: 775-776.
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H y Demura T. 2005.** Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19: 1855-1860.
- Kumari M, Taylor GJ y Deyholos MK. 2008.** Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 279: 339–357.
- Kunieda T, Shimada T, Kondo M, Nishimura M, Nishitani K y Hara-Nishimura I. 2013.** Spatiotemporal secretion of PEROXIDASE36 is required for seed coat mucilage extrusion in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25: 1355–1367.
- Lacombe E, Van Doorselaere J, Boerjan W, Boudet AM y Grima-Pettenati J. 2000.** Characterization of *cis*-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. *Plant J* 23: 663-676.
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M y Rothstein S. 1987.** Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7542-7546.
- Lagrimini LM, Gingas V, Finger F, Rothstein S y Liu TY. 1997.** Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiol.* 114: 1187-1196.
- Lai YZ y Sarkanen KV. 1975.** Structural variation in dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol. *Cellulose Chem Tech* 9: 239–245.
- Laloi C, Apel K y Danon A. 2004.** Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr Opin Plant Biol.* 7: 323–328.
- Lapierre CB, Pollet B y Rolando C. 1995.** New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res Chem Intermed* 21: 397-412.
- Laskar DD, Jourdes M, Patten AM, Helms GL, Davin LB y Lewis NG. 2006.** The *Arabidopsis* cinnamoyl CoA reductase *irx4* mutant has a delayed but coherent (normal) program of lignification. *Plant J.* 48: 674-686.
- Lauvergeat V, Rech P, Jauneau A, Guez C, Coutos-Thevenot P y Grima-Pettenati J. 2002.** The vascular expression pattern directed by the *Eucalyptus gunnii* cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. *Plant Mol Biol* 50: 497-509.
- Lee KJ, Marcus SE y Knox JP. 2011.** Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. *Mol. Plant.* 4: 212-219.
- Lee Y, Rubio MC, Alassimone J y Geldner N. 2013.** A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell.* 153: 402–412.

- Lewis NG y Yamamoto E.** 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496.
- Li F, Wang J, Ma C, Zhao Y, Wang Y, Hasi A y Qi Z.** 2013. Glutamate receptor-like channel3.3 is involved in mediating glutathione-triggered cytosolic calcium transients, transcriptional changes, and innate immunity responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 162: 1497-509.
- Li X, Bonawitz ND, Weng JK y Chapple C.** 2010. The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is independent of flavonoids. *The Plant Cell Online.* 22: 1620-1632.
- Li X, Weng, JK y Capple C.** 2008. Improvement of biomass through lignin modification. *Plant J.* 54: 569-581.
- Li Y, Kajita S, Kawai S, Katayama Y y Morohoshi N.** 2003. Downregulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. *J Plant Res* 116: 175–182.
- Liszak A, van der Zalm E y Schopfer P.** 2004. Production of reactive oxygen intermediates O_2^- , H_2O_2 , and $\cdot OH$ by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol.* 136: 3114–3123.
- Little D, Gouhier-Darimont C, Bruessow F y Reymond P.** 2007. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 784-800.
- Liu CJ.** 2012. Diciphering the enigma of lignification: Precursor transport, oxidation and the topochemistry of lignin assembly. *Mol Plant.* 1-14
- Llorente F, Lopez-Cobollo RM, Catala R, Martinez-Zapater JM y Salinas J.** 2002. A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *Plant J.* 32: 13–24.
- López Núñez-Flores MJ, Gutiérrez J, Gómez-Ros LV, Novo-Uzal E, Sottomayor M y Ros Barceló A.** 2010. Downregulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans* by gibberellic acid. *J Integr Plant Biol.* 52: 244–251.
- López-Serrano M, Fernández MD, Pomar F, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2004. *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *J Exp Bot* 55: 423-431.
- Loukili A, Limam F, Ayadi A, Boyer N y Ouelhazi L.** 1999. Purification and characterization of a neutral peroxidase induced by rubbing tomato internodes. *Physiol Plant* 105: 24-31.
- Marjamaa K, Hildén K, Kukkola E, Lehtonen M, Holkeri H, Haapaniemi P, Koutaniemi S, Teeri TH, Fagersdet K y Lundell T.** 2006. Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in lignifying xylem of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol Biol* 61: 719-732.

- Marjamaa K, Kukkola EM y Fagerstedt KV.** 2009. The role of class III peroxidases in lignification. *J Exp Bot.* 60: 367-376.
- Matlok J, Krzakowa M, y Rudolph H.** 1989. Peroxidase patterns in Bryophytes: a critical evaluation. *J Hattori Bot Lab* 67: 407-414.
- McCann MC, Defernez M, Urbanowicz BR, Tewari JC, Langewisch T, Olek A, Wells B, Wilson RH y Carpita NC.** 2007. Neural network analyses of infrared spectra for classifying cell wall architectures. *Plant Physiol.* 143:1314–1326
- McCann MC, Hammouri M, Wilson R, Belton P y Roberts K.** 1992. Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiol.* 100: 1940-1947.
- McDougall GJ.** 1992. Changes in the cell wall associated peroxidases during the lignification of flax fibers. *Phytochemistry* 31: 3385-3389.
- McEldoon JP y Dordick JS.** 1996. Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol Prog* 12: 555-558.
- McMannus MT y Ashford DA.** 1997. Glycosylation of plant peroxidases. *Plant Perox Newslett* 10: 15-23.
- Méndez-Bravo A, Calderón-Vázquez C, Ibarra-Laclette E, Raya-González J, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Guevara-García AA, López-Bucio J y Herrera-Estrella L.** 2011. Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 6: e27251.
- Miao YC y Liu CJ.** 2010. ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursor across plasma and vacuolar membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 22728-22733.
- Minic Z y Jouanin L.** 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* 44: 435-449.
- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K y Ohme-Takagi M.** 2007. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19: 270-280.
- Miyazaki S, Fredricksen M, Hollis KC, Poroyko V, Shepley D, Galbraith DW, Long SP y Bohnert HJ.** 2004. Transcript expression profiles of *Arabidopsis thaliana* grown under controlled conditions and open-air elevated concentrations of CO₂ and of O₃. *Field Crops Research.* 90: 47–59.
- Mohan R, Bajar AM y Kolattukudy PE.** 1993. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (tap 1) by wounding in transgenic tobacco and activation of tap1/GUS and tap2/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. *Plant Mol Biol* 12: 341-354.
- Mohr PG y Cahill DM.** 2007. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis*

- infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Functional and Integrative Genomics 7: 181–191.
- Möller R, Koch G, Nanayakkara B y Schmitt U.** 2006. Lignification in cell cultures of *Pinus radiata*: activities of enzymes and lignin topochemistry. Tree Physiol. 26: 201-210.
- Møller SG y McPherson MJ.** 1998. Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis atao1* gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. Plant J. 13: 781–791.
- Motose H, Fukuda H y Sugiyama M.** 2001. Involvement of local intercellular communication in the differentiation of zinnia mesophyll cells into tracheary elements. Planta 213: 121-131.
- Murashige T y Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 45: 473-497.
- Neustaedter DA, Lee SP y Douglas CJ.** 1999. A novel parsley *4CL1* cis-element is required for developmentally regulated expression and protein-DNA complex formation. Plant J 18: 77-88.
- Nilsen KL, Indiani C, Henriksen A, Feis A, Becucci M, Gajhede M, Smulevich G y Welinder KG.** 2001. Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. Biochemistry-US. 40: 11013-11021.
- Nose M, Bernards MA, Furlan M, Zajicek J, Eberhardt TL y Lewis NG.** 1995. Towards the specification of consecutive steps in macro-molecular lignin assembly. Phytochemistry 39: 71-79.
- Novo-Uzal E, Fernandez-Perez F, Herrero J, Gutiérrez J, Gómez-Ros LV, Bernal MA, Díaz J, Cuello J, Pomar F y Pedreño MA.** 2013. From Zinnia to Arabidopsis: approaching the involvement of peroxidases in lignification. J Exp Bot. 64: 3499-3518.
- Novo-Uzal E, Pomar F, Gómez-Ros LV, Espiñeira JM y Ros-Barcelo A.** 2012. Evolutionary history of lignins. En: Jouanin L and Lapierre C (eds). Advances in botanical research: Lignin: Biosynthesis, biodegradation and bioengineering. Elsevier, pp61 311-350
- Öhman D, Demedts B, Kumar M, Gerber L, Gorzsás A, Goeminne G, Hedenström M, Ellis B, Boerjan W, y Sundberg B.** 2013. MYB103 is required for FERULATE-5-HYDROXYLASE expression and syringyl lignin biosynthesis in Arabidopsis stems. Plant Journal. 73: 63-76.
- Osakabe K, Koyama H, Kawai S, Katayama Y y Morohoshi N.** 1994. Molecular cloning and the nucleotide sequences of two novel cDNAs that encode anionic peroxidases of *Populus kitakammiensis*. Plant Sci 103: 167-175.
- Østergaard L y Yanofsky MF.** (2004). Establishing gene function by mutagenesis in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal. 39: 682-696.

- Østergaard L, Teilum K, Mirza O, Mattsson O, Petersen M, Welinder KG, Mundy J, Gajhede M y Henriksen A.** 2000. *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol Biol* 44: 231-243.
- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Uría MA, Fraile B, Anadón R, Sáez FJ y de Miguel MP.** 1997. *Citología e histología vegetal y animal*. Ed McGraw-Hill Interamericana.
- Passardi F, Cosio C, Penel C y Dunand C.** 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. *Plant Cell Rep* 24: 255-265.
- Passardi F, Penel C y Dunand C.** 2004b. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 9: 534-540.
- Passardi F, Tognolli M, De Meyer M, Penel C y Dunand C.** 2006. Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta*. 223: 965–974.
- Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, Surman C, Newman LJ, Smith C, Devan MW, Mansfield S, Whetten RW, Sderoff RR y Campbell MM.** 2003. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J* 36: 743-754.
- Pedreira J, Herrera MT, Zarra I y Revilla G.** 2011. The overexpression of AtPrx37, an apoplastic peroxidase, reduces growth in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* 141: 177–187.
- Pesquet E, Ranocha P, Legay S, Digonnet C, Barbier O, Pichon M y Goffner D.** 2005. Novel markers of xylogenesis in *Zinnia* are differentially regulated by auxin and cytokinin. *Plant Physiol* 139: 1821-1839.
- Pesquet E, Zhang B, Gorzsás A, Puhakainen T, Serk H, Escamez S, Barbier O, Gerber L, Courtois-Moreau C, Alatalo E, Paulin L, Kangasjärvi J, Sundberg B, Goffner D y Tuominena H.** 2013. Non-cell-autonomous postmortem lignification of tracheary elements in *Zinnia elegans*. *Plant cell* 25: 1314-1328.
- Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2002-2007.
- Polle A, Otter T y Seifert F.** 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol* 106: 53-60.
- Pomar F, Merino F y Ros Barceló A.** 2002. O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma* 220: 17-28.
- Popescu CM, Popescu MC, Singurel G, Vasile C, Argyropoulos DS y Willfor S.** 2007. Spectral characterization of eucalyptus wood. *Appl spectrosc.* 61: 1168-1177.
- Popper ZA y Fry SC.** 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Ann Bot* 91: 1-12.
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milrad de Forchetti S, Tigier H y Valpuesta V.** 2000. A tomato

- peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1127.
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, van de Peer Y y Boerjan W.** 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 1051-1071.
- Ralph J, Bunzel M, Marita JM, Hatfield RD, Lu F, Kim H, Schatz PF, Grabber JH y Steinhart H.** 2004a. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Rev* 3: 79-96.
- Ralph J, Kim H, Lu F, Grabber JH, Leple´, JC, Berrio-Sierra J, Derikvand MM, Jouanin L, Boerjan W, y Lapierre C.** 2008. Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperm lignins (and an indicator for cinnamoyl-CoA reductase deficiency). *The Plant Journal* 53: 368–379.
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH y Boerjan W.** 2004b. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Rev* 3: 79-96.
- Ralph J, Peng J, Lu F, Hatfield RD y Helm RF.** 1999. Are lignins optically active? *J Agr Food Chem* 47: 2991-2996.
- Ralph J.** 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem. Rev.* 9: 65-83
- Ramírez V, Agorio A, Coego A, García-Andrade J, Hernández MJ, Balaguer B, Pieter BF, Ouwkerk, Zarra I y Vera P.** 2011. MYB46 modulates disease susceptibility to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 155:1920-35.
- Rana R, Langenfeld-Heyser R, Finkeldey R y Polle A.** 2010. FTIR spectroscopy, chemical and histochemical characterisation of wood and lignin of five tropical timber wood species of the family of Dipterocarpaceae. *Wood Sci Technol.* 44 225-42.
- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet AM y Goffner D.** 2002. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol:* 129 145-155.
- Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, Koen E, Poinssot B, Alcaraz G, Wendehenne D y Jeandroz S.** 2012. Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 35:1483-99.
- Reynolds GS.** 1961. Behavioral contrast. *J Exp Anal Behav.* 4: 57-71.
- Ripper P, Puyaubert J, Grisollet D, Derrier L y Matringe M.** 2009. Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149: 1251-1260.
- Roberts AW y Haigler CH.** 1994. Cell expansion and tracheary element differentiation are regulated by extracellular pH in mesophyll cultures of *Zinnia elegans* L. *Plant Physiol* 105: 699–706.

- Roberts K y McCann MC.** 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. *Curr Opin Plant Biol* 3: 517-522.
- Rogers LA y Campbell MM.** 2004. The genetic control of lignin deposition Turing plant growth and development. *New Phytol* 164: 17-30.
- Rogers LA, Dubos C, Surman C, Willment J, Cullis IF, Mansfield SD y Campbell MM.** 2005. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytol* 168: 123-140.
- Rolando C, Monties B y Lapierre C.** 1992. Thioacidolysis. In: Dence CW, Lin SY (ed) *Methods in lignin chemistry*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp 334-349.
- Ros Barceló A y Pomar F.** 2001. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. *Phytochemistry* 57: 1105-1113.
- Ros Barceló A, Ferrer MA, García-Florenciano E y Muñoz R.** 1991. The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pl in *Lupinus*. *Bot Acta* 104: 272-278.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV y Esteban Carrasco A.** 2007. Looking for syringyl peroxidases. *Trends Plant Sci* 12: 486-491.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Ferrer MA y Hernández JA.** 2006. The apoplastic antioxidant enzymatic system in the wood-forming tissues of trees. *Trees* 20: 145-156.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS y Pedreño MA.** 2004. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? *Phytochemistry Rev* 3: 61-78.
- Ros Barceló A, Paradiso A y Pomar F.** 2003. Heterogeneity in lignin monomer composition between gymnosperms and angiosperms is satisfied by means of a multifunctional basic peroxidase isoenzyme responsible for the polymerization step. En "12th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry" pp 253-256, Madison, Wisconsin USA.
- Ros Barceló A, Pomar F y Pedreño MA.** 2000. Competitive inhibitor-dissected histochemistry of the peroxidase responsible for syringyl lignin biosynthesis in *Z. elegans* xylem. *Aust J Plant Phys* 27: 1101-1107.
- Ros Barceló A, Pomar F, López-Serrano M y Pedreño MA.** 2003b. Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Funct Plant Biol* 30: 577-591.
- Ros Barceló A.** 1997. Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* 176: 87-132.
- Ros Barceló A.** 1998a. The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta* 207: 207-216.
- Ros Barceló A.** 1998b. Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Ann Bot* 82: 97-103.
- Rose JKC y Lee SJ.** 2010. Straying off the highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome. *Plant Physiol* 153: 433-436

- Ruegger M, Meyer K, Cusumano JC, Chapple C.** 1999. Regulation of ferulate-5-hydroxylase expression in Arabidopsis in the context of sinapate ester biosynthesis. *Plant Physiol.* 119:101–10
- Ruel K, Montiel MD, Goujon T, Jouanin L, Burlat V y Joseleau JP.** 2002. Interrelation between lignin deposition and polysaccharide matrices during the assembly of plant cell walls. *Plant Biol* 4: 2-8.
- Saito K y Fukushima K.** 2005. Distribution of lignin interunit bonds in the differentiating xylem of compression and normal woods of *Pinus thunbergii*. *J Wood Sci.* 51: 246–251.
- Sánchez-Romero C, García-Gómez ML, Pliego-Alfaro F y Heredia A.** 1994. Effect of partial deglycosylation on catalytic characteristics and stability of an avocado peroxidase. *Physiol Plant* 92: 97-101.
- Sarkanen KV.** 1971. Precursors and their polymerization. In: Sarkanen KV, Ludwig CH (ed) *Lignins, Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. Wiley-Interscience, New York, pp 95-163.
- Sasaki S, Nishida T, Tsutsumi Y and Kondo R.** 2004. Lignin dehydrogenative polymerization mechanism: a poplar cell wall peroxidase directly oxidizes polymer lignin and produces in vitro dehydrogenative polymer rich in β -O-4 linkage. *FEBS Lett.* 562: 197-201
- Sato Y, Sugiyama M, Komamine A y Fukuda H.** 1995a. Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. *Planta* 196: 141-147.
- Scheller HV y Ulvskov P.** 2010. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 61: 263–289.
- Sela D, Buxdorf K, Shi JX, Feldmesser E, Schreiber L, Aharoni A y Levy M.** 2013. Overexpression of *AtSHN1/WIN1* provokes unique defense responses. *PLoS One.* 8: e70146.
- Séné C, McCann MC, Wilson RH y Grinter R.** 1994. Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform Infrared spectroscopy (an investigation of five higher plant cell walls and their components). *Plant Physiol.* 106: 1623-1631.
- Sgobba A, Paradiso A, Dipierro S, De Gara L y de Pinto MC.** 2014. Changes in antioxidants are critical in determining cell responses to short - and long - term heat stress. *Physiologia plantarum*. DOI: 10.1111/ppl.12220.
- Shigeto J, Itoh Y, Tsutsumi Y y Kondo R.** 2012. Identification of Tyr74 and Tyr177 as substrate oxidation sites in cationic cell wall bound peroxidase from *Populus alba*. L. *FEBS J.* 279: 348-357.
- Shigeto J, Kiyonaga Y, Fujita K, Kondo R y Tsutsumi Y.** 2013. Putative cationic cell-wall-bound peroxidase homologues in Arabidopsis, AtPrx2, AtPrx25, and AtPrx71, are involved in lignification. *J. Agric. Food Chem.* 61: 3781–3788.

- Shigeto J, Nagano M, Fujita K y Tsutsumi Y.** 2014. Catalytic profile of Arabidopsis peroxidases, AtPrx-2, AtPrx-25 and 71, contributing to stem lignification.
- Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, Jouanin L y Séguin A.** 2005. *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C* and *-D* are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. *Plant Cell*. 17: 2059-2076.
- Siegel BZ.** 1993. Plant peroxidases – an organismic perspective. *Plant Growth Regul* 12: 303-312.
- Smith A y Veitch NC.** 1998. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr Opin Chem Biol* 2: 269-278.
- Smith RA, Schuetz M, Roach M, Mansfield SD, Ellis B y Samuels L.** 2013. Neighboring parenchyma cells contribute to Arabidopsis xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. *The Plant Cell*. 25: 3988-3999
- Stacey NJ, Roberts K, Carpita NC, Wells B y McCann MC.** 1995. Dynamic changes in cell surface molecules are very early events in the differentiation of mesophyll cells from *Zinnia elegans* into tracheary elements. *Plant J* 8: 891-906.
- Steeves C, Förster H, Pommer U y Savidge R.** 2001. Coniferyl alcohol metabolism in conifers. I. Glucosidic turnover of cinamyl aldehydes by UDPG; Coniferyl alcohol glucosyltransferase from pine cambium. *Phytochem*. 57: 1085-1093.
- Stracke R, Weber M y Weisshaar B.** 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 4: 447-456.
- Takabe K, Takeuchi M, Sato T, Ito M y Fujita M.** 2001. Immunocytochemical localization of enzymes involved in lignification of the cell wall. *J. Plant Res*. 114: 509-515.
- Takahama U.** 1993. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolic by ascorbic acid: Different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol* 34: 809-817.
- Takahama U.** 1995. Oxidation of hydroxycinnamic acid and hydroxycinnamyl alcohol derivatives by laccase and peroxidase. Interactions among *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl groups during the oxidation reactions. *Physiol Plant* 93: 61-68.
- Tamagnone L, Merida A, Parr A, Mackay S, Culianez-Macis FA, Roberts K y Martin C.** 1998. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* 10: 135-154.
- Tamasloukht B, Wong Quai Lam MS, Martinez Y, Tozo K, Barbier O, Jourda C, Alain Jauneau A, Borderies G, Balzergue S, Renou JP, Huguet S,**

- Marrant JP, Tatout C, Lapierre C, Barrière Y, Goffner D y Pichon M.** 2011. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) mutant in maize: effects on lignification, fibre development, and global gene expression. *J Exp Bot.* 62:3837–48
- Tams JW y Welinder KG.** 1995. Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Anal Biochem* 228: 48-55.
- Taylor NG, Scheible WR, Cutler S, Somerville CR, y Turner SR.** 1999. The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *The Plant Cell* 11: 769-779.
- Terashima N y Fukushima K.** 1988. Heterogeneity in formation of lignin. XI. An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Sci Technol* 22: 259–270.
- Thévenin J, Pollet B, Letarnec B, Saulnier L, Gissot L, Maia-Grondard A, Lapierre C y Jouanin L.** 2011. The simultaneous repression of CCR and CAD, two enzymes of the lignin biosynthetic pathway, results in sterility and dwarfism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant.* 4: 70-82
- Tognolli M, Penel C, Greppin H y Simon P.** 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.
- Tsutsumi Y, Nishida T y Sakai K.** 1994. Lignin biosynthesis in woody angiosperm tissues III. Isolation of substrate-specific peroxidases related to the dehydrogenative polymerization of sinapyl and coniferyl alcohols from *Populus* callus cultures. *Mokuzai Gakkaishi* 40: 1348-1354.
- Tzin V y Galili G.** 2010. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book* 8: e0132. doi: 10.1199/tab.0132.
- Ubeda-Tomas S, Edvardsson E, Eland C, Kumar Singh S, Zadik D, Aspeborg H, Gorzsàs A, Teeri TT, Sundberg B, Persson P, Bennett M y Marchant A.** 2007. Genomic-assisted identification of genes involved in secondary growth in *Arabidopsis* utilising transcript profiling of poplar wood-forming tissues. *Physiol Plant.* 129: 415-428.
- Valerio L, De Meyer M, Penel C y Dunand C.** 2004. Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry* 65: 1331-1342.
- van Parijs FR, Morreel K, Ralph J, Boerjan W y Merks RM.** 2010. Modeling lignin polymerization. I. Simulation model of dehydrogenation polymers. *Plant Physiol.* 153: 1332-1344.
- Vanden Driessche T, Kevers C, Gaspar T y Caubergs R.** 1984. Peroxidases in *Acetabularia*: their possible role in development. *Differentiation* 27: 175-181.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph y Boerjan W.** 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol* 153: 895-905.

- Vanholme R, Morreel K, Ralph J y Boerjan W.** 2008. Lignin engineering. *Curr Opin Plant Biol* 11: 278–285.
- Vanholme R, Storme V, Vanholme B, Sundin L, Christensen JH, Goeminne G, Halpin C, Rohde A, Morreel K, Boerjan W.** 2012. A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 3506–3529
- Veitch NC.** 2004. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Rev* 3: 3-18.
- Voelker SL, Lachenbruch B, Meinzer FC, Jourdes M, Ki C, Patten AM, Davin LB, Lewis NG, Tuskan GA, Gunter L, Decker SR, Selig MJ, Sykes R, Himmel ME, Kitin P, Shevchenko O, Strauss SH.** 2010. Antisense down-regulation of 4CL expression alters lignification, tree growth, and saccharification potential of fieldgrown poplar. *Plant Physiol.* 154:874–886
- Vogt T.** 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant.* 3: 2-20.
- Wagner A, Donaldson L, Kim H, Phillips L, Flint H, Steward D, Torr K, Koch G, Schmitt U y Ralph J.** 2009. Suppression of 4-coumarate-CoA ligase in the coniferous gymnosperm *Pinus radiata*. *Plant Physiol* 149: 370–383.
- Wang Y, Chantreau M, Sibout R y Hawkins S.** 2013. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Front. Plant. Scien.* 4: 1-14.
- Wang Y, Peng X, Xu W, Luo Y, Zhao W, Hao J, Liang Z, Zhang Y y Huang K.** 2012. Transcript and protein profiling analysis of OTA-induced cell death reveals the regulation of the toxicity response process in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot.* 63: 2171-87.
- Weger HG.** 1997. Interactions between Cu(II), Mn(II) and salicylhydroxamic acid in determination of algal peroxidase activity. *Phytochemistry* 46: 195-201.
- Welinder K.** 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.
- Welinder KG, Justesen AF, Kjærsgård IVH, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM y Duroux L.** 2002 Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 269: 6063-6081.
- Weng JK y Chapple C.** (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist* 187: 273–285.
- Wilson IBH.** 2002. Glycosilation of proteins in plants and invertebrates. *Curr Opin Struc Biol* 12: 569-577.
- Xu B, Escamilla-Treviño LL, Sathitsuksanoh N, Shen Z, Shen H, Zhang YH, Dixon RA y Zhao B.** 2011. Silencing of 4-coumarate:coenzyme A ligase in switchgrass leads to reduced lignin content and improved fermentable sugar yields for biofuel production. *New Phytol.* 192: 611-625.
- Yang BY, Gray JSS y Montgomery R.** 1996. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Res* 287: 203-212.

- Yang CY, Hsu FC, Li JP, Wang NN y Shih MC.** 2011. The AP2/ERF transcription factor AtERF73/HRE1 modulates ethylene responses during hypoxia in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156: 202-12.
- Yang F, Mitra P, Zhang L, Prak L, Verhertbruggen Y, Kim JS, Sun L, Zheng K, Tang K, Auer M Scheller HV y Loque D.** 2013. Engineering secondary cell wall deposition in plants. *Plant Biotech J.* 11: 325-335.
- Yokoyama R y Nishitani K.** 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis thaliana* genes involved in xylem secondary cell walls. *J Plant Res* 119: 189-194.
- Zhao Q y Dixon RA.** 2011. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought?. *Trends Plant Sci.* 16: 227-233.
- Zhao Q, Nakashima J, Chen F, Yin Y, Fu C, Yun J, Shao H, Wang X, Wang ZY y Dixon RA.** 2013. LACCASE is necessary and nonredundant with PEROXIDASE for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* DOI 10.1105/tpc.113.117770.
- Zhong R y Ye ZH.** 2014. Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis. *Plant Cell.* 229: 193-207.
- Zhong R, Demura T y Ye Z-H.** 2006. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18: 3158-3170.
- Zhong R, Lee C y Ye ZH.** 2012. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master Switches in *Arabidopsis*. *Mol. Plant.* 3: 1087-1103.
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL y Ye ZH.** 2008. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant. Cell.* 20: 2763-2782.
- Zhong R, Richardson EA y Ye ZH.** 2007. Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Planta.* 225: 1603-1611.
- Zhong RQ, Ripperger A y Ye ZH.** 2000. Ectopic deposition of lignin in the pith of stems of two *Arabidopsis* mutants. *Plant Physiol* 123: 59-69.
- Zhou J, Lee C, Zhong y Ye ZH.** 2009. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 21: 248-266.
- Zhou J, Zhong R y Ye ZH.** 2014. *Arabidopsis* NAC domain proteins, VND1 to VND5, are transcriptional regulators of secondary wall biosynthesis in vessels. *PLoS one.* 9. e105726.

Anexos

Anexo 1. Cebadores para la identificación de los mutantes homocigóticos

Nombre del gen	Secuencia (5' → 3')
SALK4_F	GATTCATTACATCCCACCAC
SALK4_R	CTCACACATTAGGGCAAGCTC
SALK52_F	ACCAGGTGTGTGTGAACCTTC
SALK52_R	AGTAGGGAGCTTACGGCTACG
SALK72_F	AGGGAAGAAGCCTGCATAAAG
SALK72_R	ATCAAGAGGCCTTCTTTGAGC
LBB1.3 SALK	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
SM52_F	CTCCAAGCTTCAACAAATATAAAGACGAA
SM52_R	CCGACGGATATAGAAACAATTCAATTACA
SPM32 SM	TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGTGA
SAIL72_F	TCTAAAAACCCAAAGCCCAAC
SAIL72_R	CTAACAGAACTCAGCCCGTG
LB1SAIL	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGC TTCC

Anexo 2. Cebadores para la realización de la RT-PCR

Nombre del gen	Secuencia (5' → 3')
RT_PRX4_F	GGAACCGGAGCTTCTACAGAT
RT_PRX4_R	TCGCTGCAGGAATTTTAGTT
RT_PRX52_F	AACGAACTTGCCCTAGAGCC
RT_PRX52_R	GATGGAGTCAGTAGAGCCGC
RT_PRX72_F	CCTAACAGAACTCAGCCCGT
RT_PRX72_R	CTCCTCTCGCGTCTCTTCTTC
RT_ACT8_F	TCTAAGGAGGAGCAGGTTTGA
RT_ACT8_R	TATCCGAGTTTGAAGAGGCTAC

Anexo 3. Cebadores para la realización de la qRT-PCR

Nombre del gen	Secuencia (5' → 3')
PRX52_F	AACGAACTTGCCCTAGAGCC
PRX52_R	GATGGAGTCAGTAGAGCCGC
PRX4_F	CTTTACGATAACTCGAGTGACATTGAC
PRX4_R	CCACCGTTGACCGGACAA
Actin_F	TGCAGACCGTATGAGCAAAGAG
Actin_R	GGTGCCACGACCTTAATCTTCA
PAL_F	CCCCCTCCGTGGTACAATC
PAL_R	AGAAGTCCGGCGATGTAGGA
4CL_F	GCCACTAAGCCTTGCCCTAATCA
4CL_R	CGTGGACGTCGGAGTAAGTGT
CCR_F	GATGTCGCGCTGGCTCAT
CCR_R	GAGCACTCTCGGCTAGGAGATAAC
F5H_F	GAGTGGGCCTTAACGGAGTTATT
F5H_R	CGACTTCGGCGAGTTCTTG
CAD_F	CAGAAGGAATGGCGGTTGA
CAD_R	AAGTGGCTCAGTGGACTGTACACA
CesA7_F	GTTTTGCGTTGGGCACTTG
CesA7_R	AGTTTGCCTCCTTTGTAGCCATA
CesA8_F	TCTTTGTGGCTTGTCATGAGTGT
CesA8_R	CAACGCAAGCAAATTCTTCGA
FRA_F	TGGCTTTCCAGCGATTGG
FRA_R	GGTATTGAGTCGAGACGAGCTTTAT
CHS_F	CGTGTTGAGCGAGTATGGAAAC
CHS_R	TGACTTCCTCCTCATCTCGTCTAGT

SMT_F	CCCCATTCATAACTGGAGGCCATG
SMT_R	ATAATTATAGGTGAAGGTCATAAGCC
MYB58_F	GAGTCATCTCCAAATGCTTCAATG
MYB58_R	CATCCCCGTAAACTCGCTATAAGT
MYB103_R	GGTTCATCTCTTGTTGGAAACCA
MYB103_R	TTAAAACGAAGAAGGGAAAGAAGAAG
SND_F	TGACTCCAAGCAAACCTCGATTT
SND_R	ACTAGCCCAGTTGCTGCAAAC