



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

**Molecular and Functional Characterization of One Peroxidase
Responsible for the Lignin Biosynthesis in Vascular Plants**

**Caracterización Molecular y Funcional de una Peroxidasa
Responsable de la Síntesis de Ligninas en Plantas Vasculares**

**D. Carlos Gabaldón Caballero
2015**



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

**Molecular and functional characterization of one peroxidase
responsible for the lignin biosynthesis in vascular plants**

**Caracterización molecular y funcional de una peroxidasa
responsable de la síntesis de ligninas en plantas vasculares**

D. Carlos Gabaldón Caballero

2015

Al Ilmo. Catedrático Sr.

D. Alfonso Ros Barceló

A la Catedrática Sra.

Dña. María de los Ángeles Pedreño García

A Arturo Gabaldón Ayala

○ Introducción	3
I. La pared celular vegetal	5
II. Lignificación del xilema	8
II.1. Naturaleza, composición y localización de las ligninas.....	10
II.2. Ligninas en <i>Zinnia elegans</i>	13
<i>Patrón de lignificación de Z. elegans</i>	
II.3. Biosíntesis de ligninas.....	15
II.4. Transporte de monolignoles.....	17
II.5. La etapa de polimerización.....	19
II.6. Lignificación en la célula vegetal.....	21
II.7. Restricciones impuestas por el mecanismo de polimerización.....	22
II.8. Regulación de la lignificación.....	23
III. Peroxidasas	27
III.1. Naturaleza y estructura.....	28
III.2. Funciones de las peroxidasas de clase III.....	30
III.3. Papel fisiológico en la lignificación.....	31
III.4. La peroxidasa básica de <i>Zinnia elegans</i>	34
IV. Peroxidasas y Óxido Nítrico (NO)	37
IV.1. Riqueza química de una molécula señal sencilla en Plantas.....	38
IV.2. Propiedades anti-oxidantes y pro-oxidantes del NO.....	41
IV.3. Mecanismos de producción del NO en plantas.....	42
<i>Óxido nítrico sintasa</i>	
<i>Nitrato reductasa</i>	
<i>Otras fuentes de producción</i>	
IV.4. Transducción de la señal del NO.....	46
IV.5. Funciones biológicas del NO en plantas.....	50
<i>NO y hormonas</i>	

<i>NO y estrés abiótico</i>	
<i>NO e interacciones bióticas</i>	
<i>NO y muerte celular programada</i>	
IV.6. Efecto del NO sobre las peroxidasas.....	55
IV.7. Detoxificación de NO.....	57
IV.8. Rutas mediadas por peroxidasa que sintetizan NO.....	59
○ <u>Índice de Artículos por Capítulos</u>	61
○ <u>Capítulo 1</u>	
▪ Objetivos y conclusiones	63
▪ Contribución	69
▪ Artículos publicados	71
○ <u>Capítulo 2</u>	
▪ Objetivos y conclusiones	157
▪ Contribución	165
▪ Artículos publicados	167
○ <u>Anexo</u>	
▪ Contribución	209
▪ Artículos publicados	211
○ <u>Bibliografía de la Introducción</u>	239

Para el desarrollo de esta Memoria que constituye la Tesis Doctoral titulada **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE UNA PEROXIDASA RESPONSABLE DE LA SÍNTESIS DE LIGNINAS EN PLANTAS VASCULARES”** es preciso introducir los conceptos tanto teóricos como experimentales que nos servirán para entender el flujo de trabajo de esta Tesis por compendio de publicaciones y para alcanzar los Objetivos propuestos, a partir de una planta *Zinnia elegans*, utilizada como modelo para estudiar la lignificación y la xilogénesis, y para dilucidar el mecanismo por el que se produce la lignificación en las plantas vasculares terrestres.

Por ello, es necesario introducir los conceptos que se desarrollan a nivel más concreto en cada publicación, en tres apartados básicos.

- La **“Lignificación del Xilema”** es un proceso biológico inherente a la existencia de las plantas vasculares terrestres, imprescindible en nuestro trabajo para poder ubicar nuestro campo de investigación a nivel de su **“Naturaleza, composición y localización de las ligninas”**, poder observar la complejidad química de las ligninas a lo largo del curso de la evolución, estudiando las **“Diferencias de las ligninas entre gimnospermas y angiospermas”**, para poder adentrarnos en **“Las ligninas en *Zinnia elegans*”** que será el material vegetal que nos servirá de modelo para nuestros estudios y que nos proporcionará versatilidad según el material u órgano de partida de dicha planta monocotiledónea, para finalmente poder comprender el papel de las enzimas a estudiar, las peroxidasas, en la **“Ruta metabólica de la síntesis de ligninas”**.

- Las **“Peroxidasas”** se han considerado las principales enzimas implicadas en el último paso del proceso de biosíntesis de ligninas a partir de los alcoholes hidroxicinámicos, por lo que es necesario conocer su **“Ciclo Catalítico”**, por ser las enzimas que catalizan la oxidación en etapas monoelectrónicas de los alcoholes hidroxicinámicos que principalmente forman las ligninas, su **“Naturaleza y estructura”** para poder adentrarnos en su caracterización molecular y funcional tan puntera en estos tiempos, su **“Polimorfismo”** para seguir adentrándonos en los estudios de biología

molecular de esta enzima, todo ello con el fin de poder indagar más a fondo el “Papel de las peroxidasas en la polimerización de los monómeros precursores de las ligninas”, pudiendo finalmente estudiar las “Peroxidasas fuertemente básicas”, ya que la versatilidad de estas isoenzimas es tal que la preferencia de sustrato cubre a los tres p-hidroxibenzaldehidos y a los tres ácidos p-hidroxicinámicos, sugiriendo que dicha peroxidasa juega un papel clave en la lignificación de la pared celular. Además, una prueba definitiva del papel de estas peroxidasas en la lignificación se obtiene del uso de los cultivos de células de mesófilo que sufren una diferenciación a traqueidas, pudiendo utilizar este cultivo *in vitro* como sistema de “Formación de traqueidas” para conocer la implicación de esta Peroxidasa en dicho sistema.

- Tanto en los sistemas vasculares de plantas terrestres a nivel del xilema, como en los cultivos *in vitro* de traqueidas, es imprescindible que se produzca la muerte celular programada (MCP) ya que la adquisición de función en estas células está precedida por dicha muerte celular, de ahí la importancia de la relación entre “Peroxidasas y óxido nítrico (NO)”, ya que el “NO actúa como molécula señal en plantas”, y una de las “funciones biológicas del NO en Plantas” es la relación del “NO y MCP”, además del papel del NO sobre las Peroxidasas, los estudios de detoxificación del NO” y de las “Rutas mediadas por peroxidasas que sintetizan NO”.

De tal forma, la introducción de la Tesis se desarrolla sobre estos cuatro pilares básicos que son: I. La pared celular vegetal, II. La lignificación del Xilema, III. Peroxidasas y IV. Peroxidasas y Óxido Nítrico.

INTRODUCCIÓN

I. LA PARED CELULAR VEGETAL

Las células vegetales presentan, externamente a la membrana plasmática, una pared celular muy gruesa compuesta básicamente de celulosa, aunque pueden formar parte 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 es 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 varias funciones fisiológicas tales como 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 celular, el metabolismo celular, 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. La lámina media 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).

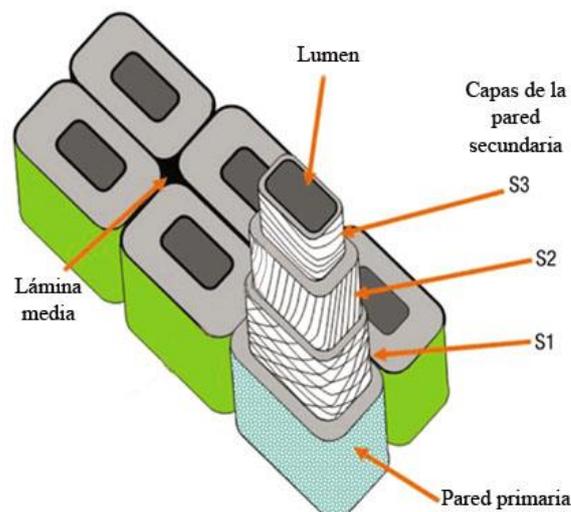


Figura 1.1. Dibujo esquemático de la pared celular vegetal donde se muestran las distintas capas de la pared secundaria (S₁, S₂ y S₃). Tomado de Kretschmann (2003).

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% 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 de ferúlico que entrecruzan las cadenas de xilano, y que no están presentes en las paredes celulares de tipo I.

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 sílice) (Paniagua y cols. 1997). La pared celular secundaria comprende tres subcapas: S₁, S₂ y S₃, 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 proteína arabinogalactano (Fukuda 1996). Dentro de estas últimas, Motose y cols. (2001), identificaron una proteína de 25 kDa que mediaba la comunicación intercelular local 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 en el xilema 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 esenciales para la síntesis de ligninas se han utilizado como marcadores de la lignificación durante la diferenciación del xilema (Fukuda 1992).

II. LA LIGNIFICACIÓN DEL XILEMA

El xilema constituye una vía de baja resistencia para el transporte del agua en plantas vasculares. El xilema transporta el agua eficazmente desde los lugares de absorción en la raíz hasta las superficies de evaporación en las hojas. La mayoría de las células terminales diferenciadas realizan funciones especializadas antes de que en ellas se produzca la muerte celular programada pero, en el caso del xilema, la adquisición de función implica dicha muerte celular. Así, las células conductoras de agua funcionales no tienen membranas ni orgánulos y lo que permanece son las paredes celulares engrosadas y lignificadas, que forman tubos

huecos a través de los cuales el agua puede fluir con una resistencia relativamente baja (Figura 2.1) (Kozela y Regan 2003).

Los elementos diferenciados del xilema (células conductoras de agua) se encuentran revestidos internamente de ligninas (del latín *lignum*: leño) que son heteropolímeros fenólicos tridimensionales covalentemente asociados a la matriz polisacáridica de las paredes celulares del xilema (Anterola y Lewis 2002). Las ligninas también se encuentran en otros tejidos de sostén, tales como las fibras del floema, y son el resultado de la polimerización oxidativa de tres alcoholes p-hidroxicinámilicos (p-cumarílico, coniferílico y sinapílico), en una reacción mediada por lacasas (Liu y cols. 1994) y peroxidasas (Ros Barceló 1997), produciendo 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 (Grabber et al. 1998; Vanholme y cols. 2010). En este contexto, la degradación de la pared celular vegetal es uno de los principales factores restrictivos en el uso y reciclaje de la biomasa vegetal (Anterola y Lewis 2002; Weng y cols. 2008).

Las ligninas representan el segundo compuesto orgánico más abundante sobre la superficie de la tierra después de la celulosa, y constituye alrededor del 25% de la biomasa vegetal (Higuchi 1990; Ros Barceló 1997). Se encuentran principalmente en plantas vasculares (tracheophyta) y se localizan preferentemente en las paredes celulares secundarias de células que forman parte de tejidos leñosos como fibras, vasos del xilema, traqueidas y esclereidas. Se han identificado ligninas en pteridofitas (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 (Niklas 1997). Así, desde el punto de vista botánico, el fenómeno de la lignificación está asociado a la adquisición de la estructura vascular en las plantas.

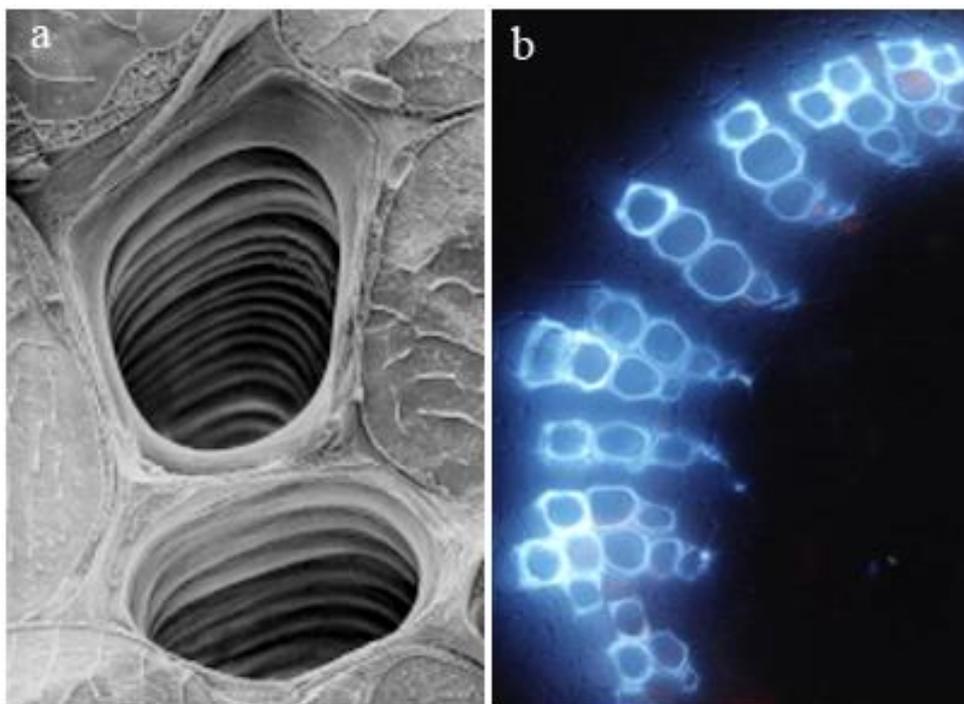


Figura 2.1. (a) Microfotografía electrónica de barrido del xilema de los tallos lignificantes de *Z. elegans*, cortesía de Kim Findlay para Roberts y McCann 2000. (b) Vasos del xilema teñidos con Calcofluor White mostrando la fluorescencia de las ligninas en las paredes celulares. Ambos son cortes transversales.

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. 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, se destaca la lignificación 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

Las ligninas son heteropolímeros fenólicos y amorfos que resultan del acoplamiento oxidativo de tres alcoholes p-hidroxicinamílicos (Figura 2.2), alcohol

p-cumarílico (I), alcohol coniferílico (II) y alcohol sinapílico (III) en una reacción mediada por peroxidasa (Ros Barceló 1997). Esta reacción produce un heteropolímero hidrofóbico ópticamente inactivo (Ralph y cols. 1999) compuesto por unidades H (*p*-hidroxifenilo), unidades G (guayacilo) y unidades S (siringilo) respectivamente. El hecho de que los tres constituyentes monoméricos de las ligninas difieran en el grado de metoxilación (Figura 2.2) y de que para cada uno de los tres bloques de construcción, el radical tenga al menos, cinco formas mesoméricas (Figura 2.2) sugiere que se pueden formar una gran cantidad de subestructuras durante la dimerización (Ros Barceló y cols. 2004, 2007).

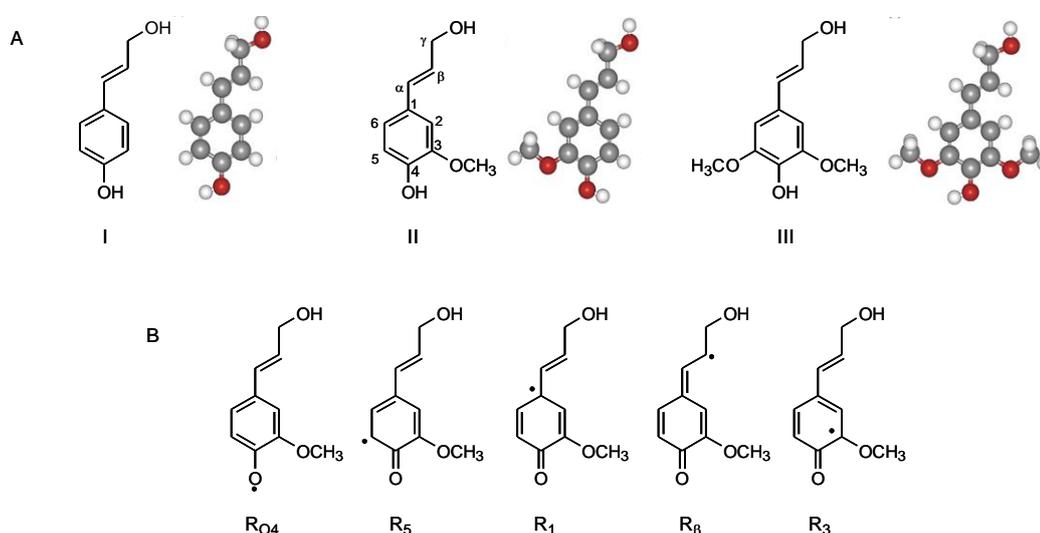


Figura 2.2. Estructuras de los alcoholes *p*-cumarílico (I), coniferílico (II) y sinapílico (III). **2.** Principales formas mesoméricas de los radicales del alcohol coniferílico formados durante la oxidación del alcohol coniferílico por la peroxidasa. Tomado de Ros Barceló y cols. (2004,2007). Los átomos de C, O e H se muestran en gris, rojo y blanco, respectivamente.

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 2.3). 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 dihidrocinámicos 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 2.3).

La composición de las ligninas varía 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).

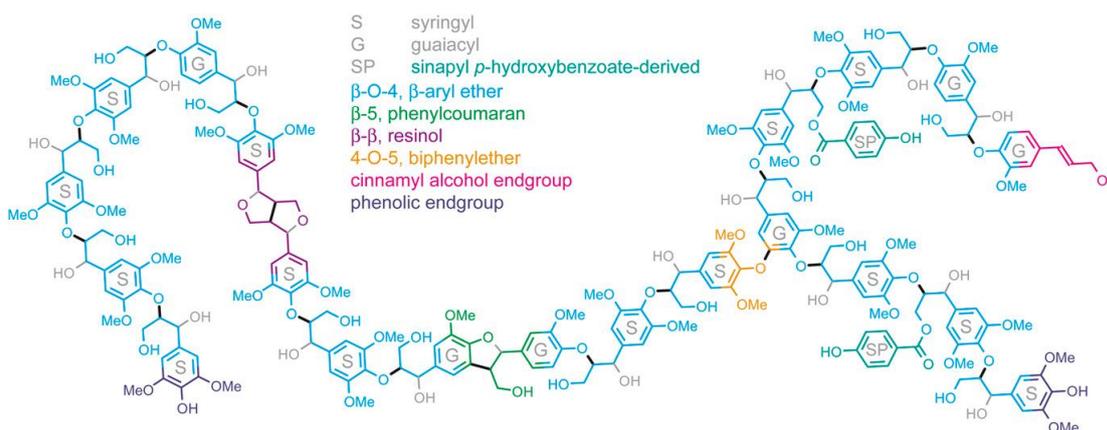


Figura 2.3. Estructura extendida de las ligninas de álamo a partir de datos obtenidos mediante RMN mostrando los diferentes tipos de enlaces. Tomado de Vanholme y cols. (2010).

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, en cambio 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)

Esta variación en la composición de ligninas además es apreciable bajo ciertas circunstancias 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. Ligninas en *Zinnia elegans*

Z. elegans se usa comúnmente como un modelo en los estudios de lignificación (Fukuda 1996), y es ideal, primeramente debido a la *simplicidad y la dualidad del patrón de lignificación* que muestran los tallos y los hipocotilos y, segundo, debido a la naturaleza del *patrón isoenzimático de la peroxidasa*, que se encuentra casi completamente restringido a la presencia de una isoenzima de peroxidasa básica. Además, *Z. elegans* ofrece la *posibilidad de trabajar con cultivos celulares* que se asemejan a las células del xilema en diferenciación (Pesquet y cols. 2003) y de hecho, se ha usado como modelo para medir la expresión de las enzimas de la ruta biosintética de las ligninas, especialmente el tramo correspondiente a los esqueletos fenilpropanoides (Demura y cols. 2002, Milioni y cols. 2002). El motivo de esto es que la diferenciación de las células de mesófilo a traqueidas se induce de manera sincrónica en una población celular relativamente homogénea, haciendo posible el estudio bioquímico y fisiológico de la xilogénesis, libre de la complejidad impuesta por los tejidos vegetales heterogéneos (Roberts y McCann 2000, Milioni y cols. 2002).

Patrón de lignificación de Z. elegans

El patrón de lignificación de *Z. elegans* es especial ya que, en un determinado estado de desarrollo ofrece simultáneamente los dos modelos de lignificación que encontramos en gimnospermas y angiospermas. Así, en plantas de 25-30 días, el análisis de los productos de oxidación con nitrobenzeno ha revelado que las ligninas del hipocotilo están formadas principalmente por unidades G/S en una relación 43/57, mientras que, las ligninas del tallo contienen cantidades considerables de unidades H, en una relación H/G/S de 22/56/22. Por tanto, las unidades S predominan en el hipocotilo, mientras que las unidades G lo hacen en el tallo. En este sentido, las ligninas del hipocotilo de *Z. elegans* son típicas de angiospermas mientras que las ligninas del tallo se asemejan parcialmente a las de gimnospermas, ya que la suma (H+G) constituye el 78% de las unidades estructurales de las ligninas (Ros Barceló y cols. 2004).

II.3. 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 hayan sido obtenidos 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, entre otros (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 (Figura 2.4) se desarrolla a través de una larga secuencia de reacciones que implican a:

i) La ruta del siquimato 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 vía de las pentosas fosfato) (Herrmann 1995).

ii) La ruta común fenilpropanoide, desde L-fenilalanina (y/o L-tirosina) hasta *p*-hidroxicinamil CoA. Las enzimas que participan en esta ruta son la fenilalanina amonioliasa (PAL), la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), la cumarato-3-hidroxilasa (C3H), las *O*-metil-transferasas (OMT) dependientes de *S*-adenosil-*L*-metionina, tales como la cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa (CCoAOMT) y la *p*-hidroxicinamato CoA ligasa (4CL). 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 los órganos vegetales.

iii) La ruta específica de la biosíntesis de las ligninas, que conduce *p*-hidroxicinamil-CoA hacia la síntesis de los alcoholes cinámicos. Estas dos reacciones son catalizadas por las enzimas *p*-hidroxicinamil-CoA reductasa (CCR) y la *p*-hidroxicinamil alcohol deshidrogenasa en sus formas coniferil alcohol deshidrogenasa (CAD). 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)

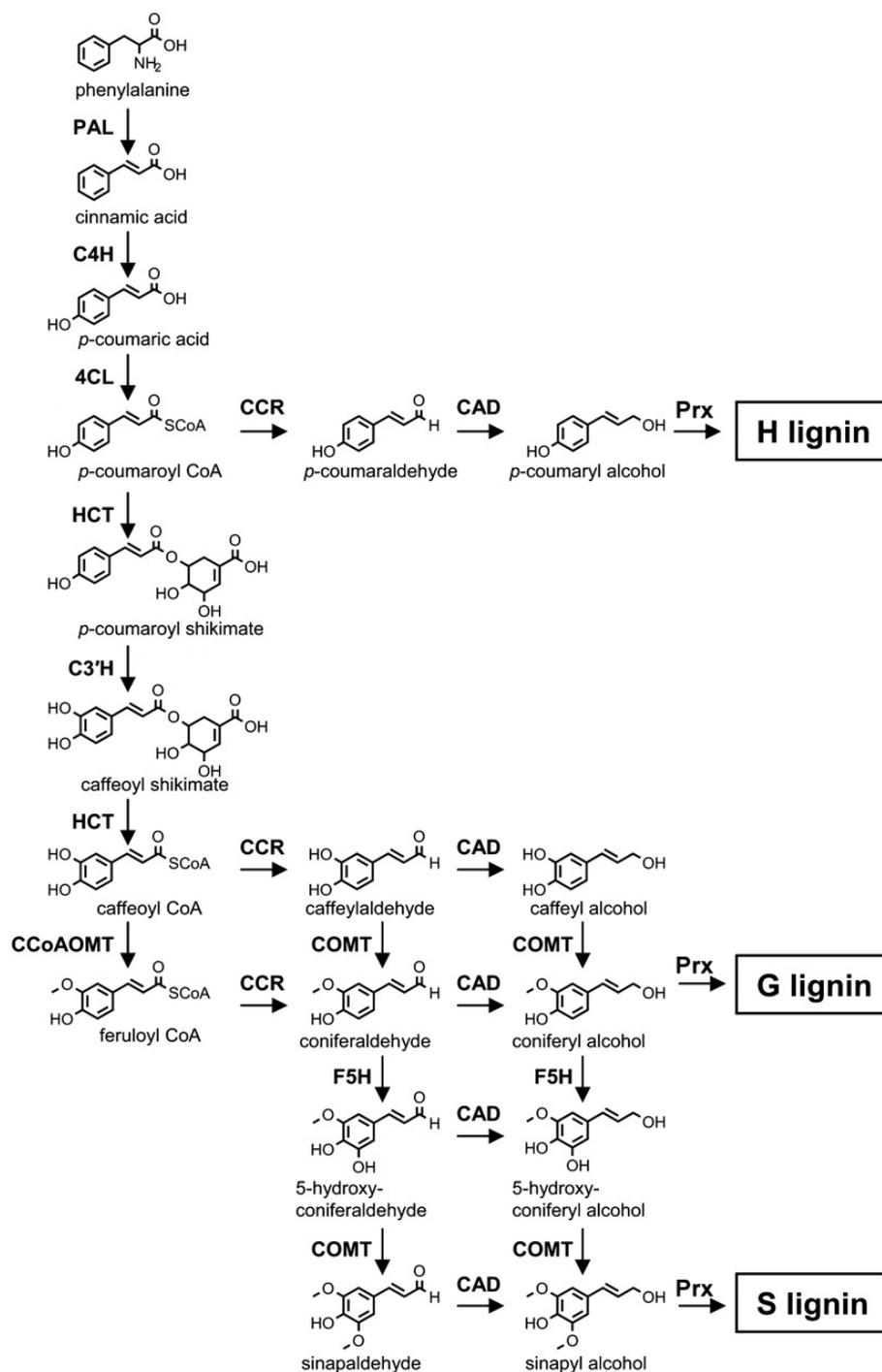


Figura 2.4. Ruta de biosíntesis de los monolignoles: PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato CoA ligasa; HCT: hidroxicinamil CoA transferasa; C3'H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; CCoAOMT: cafeoil-CoA-O-metiltransferasa; CCR: cinamil-CoA reductasa; COMT: ácido cafeico O-metiltransferasa; CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; F5H: ferulato 5-hidroxilasa; Prx: Peroxidasa. Modificado de Li y cols. (2010).

II.4. Transporte de monolignoles

Tras su síntesis en el citosol, los monolignoles deben desplazarse 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-glucósidos. 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 glicosiltransferasas y 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 prerequisite para el almacenamiento en la vacuola, mientras que las formas no glicosiladas son directamente exportadas a la pared celular.

II.5. 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 cinamílicos. Esta etapa ocurre a través de la oxidación de los de los alcoholes cinamílicos 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 cinamílicos y se produzca de esta manera la formación de un polímero en crecimiento. Este proceso recibe el nombre de *polimerización lineal* (Vanholme y cols. 2010). Este tipo de polimerización lineal 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 tipo G (Wagner y cols. 2009). Esta diferencia en la polimerización se debe en parte a la presencia de unos u otros alcoholes cinamílicos. 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 de la polimerización en masa (Demont-Caulet y cols. 2010).

Los alcoholes hidroxicinamílicos 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 del H_2O_2 (Nose y cols. 1995, Ros Barceló y Pomar 2001) suministrado por una enzima 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.

Las peroxidasas y lacasas pueden ser las responsables de la oxidación de los alcoholes hidroxicinamílicos, pero se sabe que un monolignol oxidado puede

ceder su radical a otro monolignol, a un dilignol o al polímero de lignina en crecimiento lo cual implica que no solo las peroxidasas son capaces de formar los radicales de los monolignoles, haciendo que el proceso de polimerización sea aun más complejo (Wang y cols. 2013). Al mismo tiempo que se produce la polimerización de las ligninas, éstas pueden unirse a los polisacáridos de la pared celular por la adición nucleofílica de los grupos hidroxilo de los polisacáridos a la estructura metiluro quinona que resulta del acoplamiento β -O-4 de dos radicales monolignoles. A través de este mecanismo, las ligninas aportan fuerza a las paredes celulares vegetales, facilitan el transporte de agua e impiden la degradación de los polisacáridos de la pared, actuando así como una mejor línea de defensa contra vertebrados herbívoros, insectos y hongos.

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

- i) mostrar una especificidad de sustrato por los alcoholes cinamílicos
- 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 cinamílicos 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 cinamílicos, 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 cinamílicos a ligninas. No obstante, las peroxidasas reúnen bastantes de los requisitos previamente definidos. Así, estas enzimas muestran una gran afinidad por los alcoholes cinamílicos 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.6. 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), 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: I) ser transportados al apoplasto y allí ser oxidados por peroxidasas o lacasas; II) ser glicosilados, y una vez glicosilados ser transportados a la vacuola. 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).

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. 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.7. Restricciones impuestas por el mecanismo de polimerización

El mecanismo de polimerización, tal como actualmente es conocido (Freudentberg y cols. 1965, Hatfield y Vermerris 2001), impone ciertas restricciones al proceso de lignificación. Si los sustratos (los monolignoles y el H₂O₂) 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 H₂O₂ 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. En este tipo de polimerización rápida da lugar a lo que se conoce como *polimerización en masa (bulk polymerization)* mencionada en el apartado II.5. En contraste, la polimerización que ocurre 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 son depositadas 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.8. 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 (Figura 2.5). De esta manera, mediante análisis de delección en el promotor del gen *PAL* se identificaron los elementos *cis* críticos para la expresión específica en los distintos tejidos.

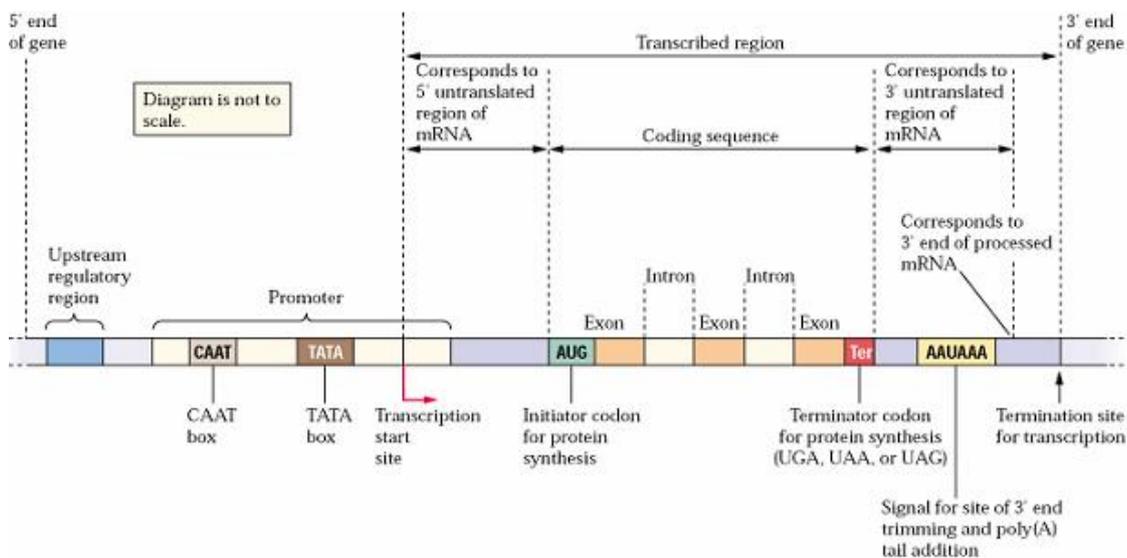
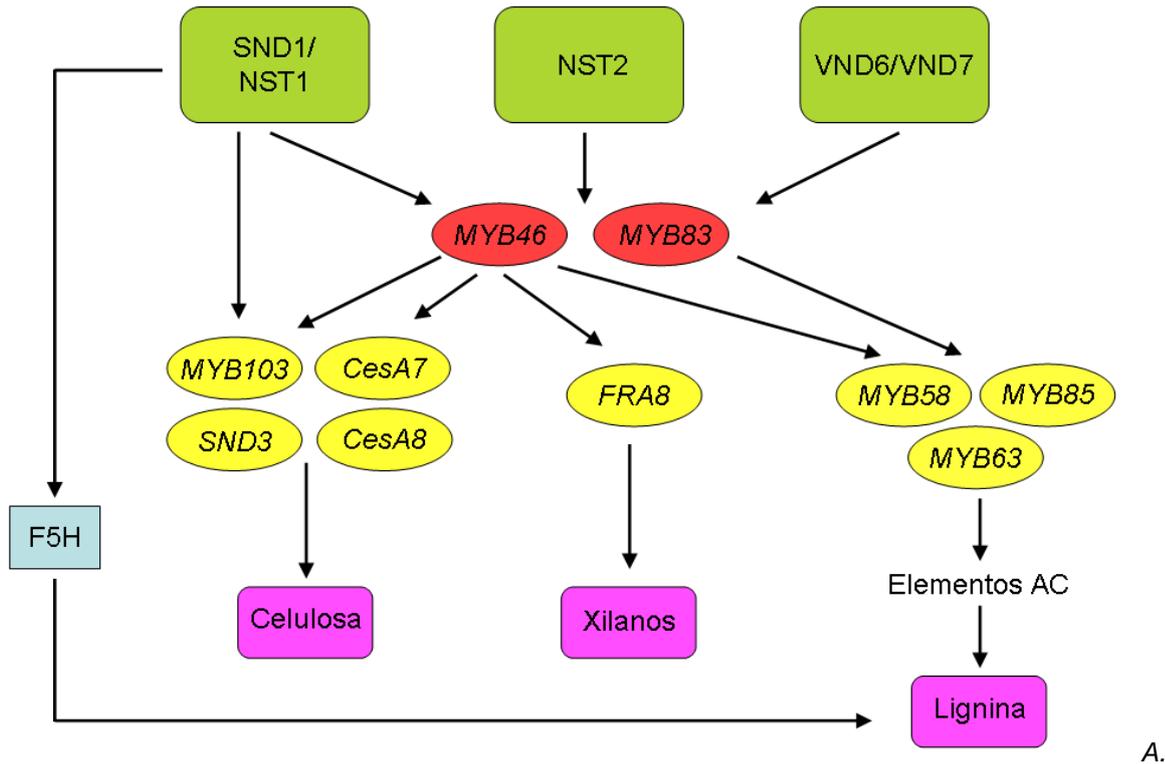


Figura 2.5. Estructura y organización de un gen eucariota. El gen se divide en varias secciones. La región transcrita actúa como molde para la síntesis de ARN, que se edita y traduce en el producto proteico del gen. La región transcrita contiene secuencias codificantes (exones) y secciones no codificantes (intrones). La región transcrita está flanqueada a ambos lados por secuencias no codificantes que actúan en la regulación del gen. La mayoría de los elementos de las secuencias reguladoras están en la región 5'. Los primeros 1000 pb de la región 5' se denominan promotor, ya que contiene secuencias importantes para la “promoción” de la transcripción. Estos motivos se llaman “elementos *cis*”. El elemento *cis* más conservado es la caja TATA, que habitualmente se encuentra en los primeros 50 pb del punto de inicio de la transcripción. Tomado de Buchanan y cols. 2000.

El análisis de la región reguladora 5' de varios genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de ligninas revela un motivo común. Los promotores de estos genes se caracterizan por la presencia de motivos conservados, conocidos como elementos AC, cajas H o cajas PAL (Bell-Lelong y cols. 1997, Lacombe y cols. 2000, Lauvergeat y cols. 2002). Estos motivos deben su nombre a que son ricos en citosina y adenosina, y se encuentran en los genes de PAL, C4H, COMT, CCoAOMT, 4CL, CCR y CAD pero no están presentes en el gen de F5H. La ubicuidad de estos elementos en los promotores de estos genes sugiere que podrían actuar como una diana dentro de un mecanismo regulador común (Patzlaff y cols. 2003). Además de los elementos AC, existen otros elementos *cis*, como el elemento FP56 identificado en el promotor de 4CL, que también tienen importancia en la regulación de la expresión génica (Neustaedter y cols. 1999). De los 12 genes que se enumeran como participantes directos en la biosíntesis de ligninas en *Arabidopsis*, 10 de ellos contienen al menos una copia de un elemento AC (Rogers y Campbell 2004).

Existen factores de transcripción que interaccionan con los elementos AC y que podrían estar implicados en el control de la lignificación. La familia de factores transcripcionales MYB es una de las clases más abundantes en las plantas y la subfamilia que contiene el dominio R2R3 de unión al ADN es la más grande (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 transgénico se acumulan menos compuestos fenólicos que en las plantas controles y se reduce la cantidad de ligninas en los tejidos vasculares.

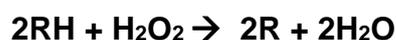


En *Arabidopsis* existen tres factores de transcripción implicados directamente en la síntesis de ligninas, ya que son capaces de unirse a los elementos AC presentes en los promotores de los genes que codifican para las enzimas que participan en la ruta de síntesis de los monolignoles (MYB58, MYB63 y MYB85) (Figura 1.10). 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 síntesis 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, 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 síntesis 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). 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 otros factores transcripcionales que tienen la capacidad de regular la expresión de algunos genes de la biosíntesis de ligninas. Así, 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;



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 del 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. 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 3.1.) 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 así como la histidina proximal que se encuentra coordinada con el Fe^{3+} y el hidrógeno unido al ácido aspártico.

En todas las peroxididasas 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 peroxididasas vegetales de secreción (Converso y Fernández 1996) y las cadenas a las que están unidos están altamente conservadas (Welinder y cols. 2002).

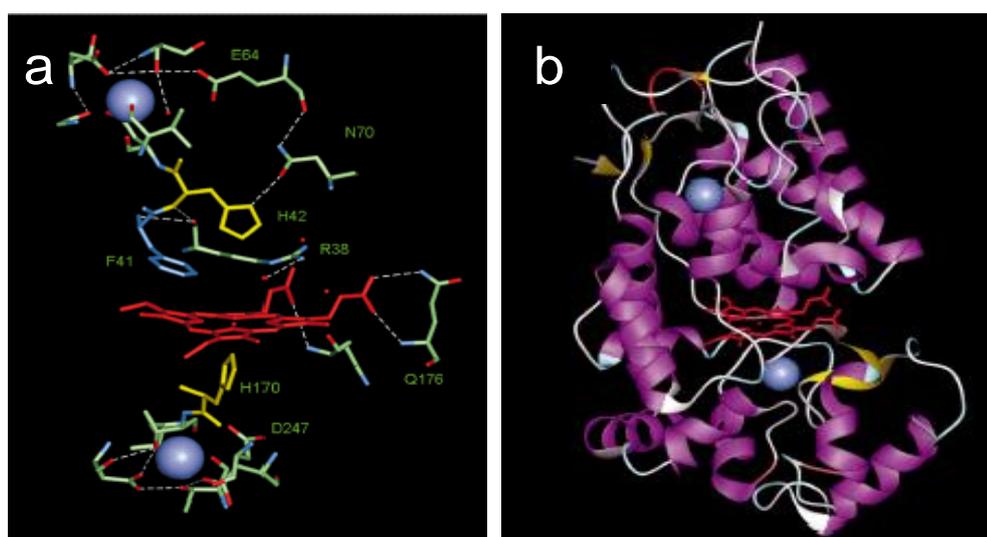


Figura 3.1. Ordenación espacial del centro activo de las peroxididasas. El grupo hemo (en rojo) está coordinado por la histidina proximal, H170, y el sexto sitio de coordinación está vacante (a). Estructura tridimensional de la isoenzima C de la peroxidasa de rábano (HRP C); las regiones plegadas helicoidalmente 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 peroxidasas 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 ARNm de las peroxidasas 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 ARNm, 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, McManus 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, 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 H₂O₂ (Sgobba y cols. 2014) y las de clase II que participan en la degradación de residuos de suelo (Martinez y cols.

2005) asignar una función particular a las de clase III es bastante más complejo, debido al gran número de genes e isoenzimas presentes 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 H₂O₂, 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 estadio 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 mensajeros 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 que las codifican 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 de la planta (Loukili y cols. 1999, Allison y Schultz. 2004).

III.3. Papel fisiológico 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 cinamílicos, diversos estudios realizados con plantas transgénicas de

tabaco muestran que una reducción significativa en la expresión de una isoenzima ácida de la peroxidasa no viene acompañada de una reducción de la lignificación (Lagrimini y cols. 1997), y arrojan ciertas dudas sobre la participación exclusiva de las peroxidases ácidas en este proceso.

Otro aspecto que deberían cumplir las enzimas que participasen en la polimerización de los alcoholes cinamílicos es la de presentar una correlación cuantitativa con la lignificación. En el caso de las peroxidases, 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 píceas noruegas (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 cinamílicos. 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 la 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 la peroxidasa pueden mostrar una cierta especificidad de sustrato y fuertes diferencias en su reactividad con los alcoholes cinamílicos. Cuando se estudian las afinidades de varias peroxidases básicas aisladas de tejidos lignificantes por los alcoholes cinamílicos, 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 peroxidases son menores que los mostrados por las lacasas vegetales (12 mM) (Bao y cols. 1993), y se encuentran dentro del orden (5-500 μM) 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 μM (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 (Figura 3.2), 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. 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) incluso en ciertas condiciones puede ser aportado por las propias peroxidasas ya que presenta 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 (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 *Z. elegans* y 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)

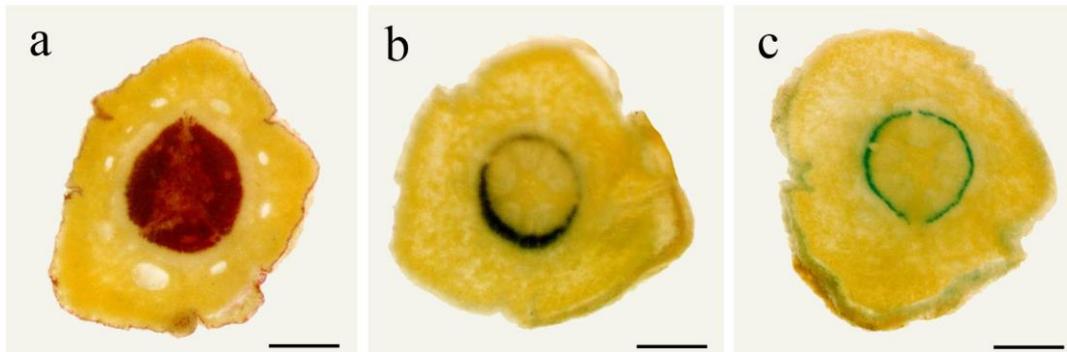


Figura 3.2. Secciones transversales de *Pinus halepensis* después de teñir con floroglucinol para revelar la presencia de ligninas (a), con KI-almidón para mostrar la localización del H_2O_2 (b), y TMB, que indica la co-localización de la peroxidasa y el H_2O_2 (c). Barras= 300 μ m. Tomado de Gómez Ros 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 se ha caracterizado en la presente Memoria y comprobado su implicación en la responsable de la lignificación.

Los tallos y los hipocotilos de *Z. elegans* expresan la misma isoenzima básica de peroxidasa (López-Serrano y cols. 2004). Esta isoenzima de peroxidasa 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, 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. 1999).

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 2002b, López-Serrano y cols. 2004). Existe un consenso general (Boerjan y cols. 2003) que las peroxidasas 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* 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 peroxidasas 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 interaccionar con el promotor de ZePrx. Todo ello pone de manifiesto la implicación de esta peroxidasa en el proceso de lignificación.

IV. Peroxidasas y Óxido Nítrico

La primera evidencia de la producción de óxido nítrico (NO) por células animales data de 1980, año en el que Furchgott describió como una sustancia formada en el endotelio era capaz de relajar las células del músculo liso, sustancia que denominó *factor relajante derivado del endotelio* (EDRF). Algunos años antes, Murad (Arnold y cols., 1977) describió que la nitroglicerina activaba la actividad guanilato ciclasa (GC) y que, a través de la producción de GMP_c, relajaba las fibras musculares. Este descubrimiento planteó la cuestión de cómo la nitroglicerina aplicada externamente afectaba a una enzima del interior celular. La respuesta se encontraba en que la nitroglicerina estaba contaminada con trazas de NO, ya que cuando Murad (Arnold y cols., 1977) burbujeó este gas sobre células de músculo liso se activaba la actividad GC, planteando la hipótesis de que las hormonas regulaban este tejido a través del NO mucho antes de que se descubriera la producción del NO por células eucariotas por Hibbs y Bastian en 1999.

Algunos años después y trabajando de manera independiente, Ignarro y cols. (1987) demostraron que el NO exhibía las mismas características químicas que la sustancia descubierta por Furchgott (EDRF). En este momento, las investigaciones sobre las funciones biológicas del NO se realizaron en laboratorios de todo el mundo. El hecho de tratarse de una molécula gaseosa inestable que, en presencia de H₂O₂ y O₂, rápidamente se convierte en NO₃⁻ y NO₂⁻ ralentizó el avance en su conocimiento.

El NO se ha identificado como una molécula señal crítica en el mantenimiento de la presión sanguínea en el sistema cardiovascular de los animales, estimuladora de las defensas en el sistema inmunológico, reguladora de la transmisión neuronal en el cerebro, reguladora de la expresión génica, de la agregación plaquetaria, del aprendizaje y la memoria, de la función sexual masculina, implicada en procesos de citotoxicidad y citoprotección y reguladora del desarrollo de la arteriosclerosis (Jeffrey y Snyder, 1995; Lipton y cols., 1993; Lloyd-Jones y Bloch, 1996; Moncada y cols., 1991; Palevitz y Lewis, 1998).

En 1992, la revista *Science* denominó al NO como *molécula del año* debido a su importancia biológica tan extendida y, en 1998, los Doctores Furchgott, Murad e Ignarro fueron galardonados con el Premio Nobel en Fisiología y Medicina.

Los estudios del NO en plantas se iniciaron con el estudio de las propiedades fitotóxicas de los óxidos de nitrógeno (NO_2 y N_2O_3) y su efecto sobre los enzimas que contenían iones metálicos (Martin y cols., 1981; Rowland y cols., 1985). Diez años después, Welburn (1990) planteó la cuestión de por qué los óxidos de nitrógeno atmosféricos eran considerados fitotóxicos y no fertilizantes alternativos. En aquella época, varios investigadores descubrieron que los óxidos de nitrógeno estimulaban la germinación de semillas (Grubusic y cols., 1990, 1992), y estos resultados dieron lugar a una explosión de investigaciones en plantas sobre los efectos de esta nueva y fascinante molécula.

IV.1. Riqueza química de una molécula señal sencilla en Plantas

El NO es un radical libre gaseoso que contiene un electrón desapareado en un orbital π antienlazante ($2p^1$). Debido a su naturaleza de radical libre, este puede adoptar una estructura electrónica más favorable energéticamente por ganancia o pérdida de un electrón, por lo que el NO puede encontrarse bajo tres estados redox intercambiables (Figura 4.1): bien como radical $\text{NO}\cdot$, o bien como catión nitrosonio NO^+ o anión nitrosilo NO^- .

Su pequeño radio de Stockes y su carga neutra permite su difusión rápida a través de las membranas y el interior celular. Sin embargo, al ser una molécula radical, posee una vida media relativamente corta, de unos pocos segundos, por lo que su campo de acción se limita a la célula dónde se ha generado o a las células vecinas.

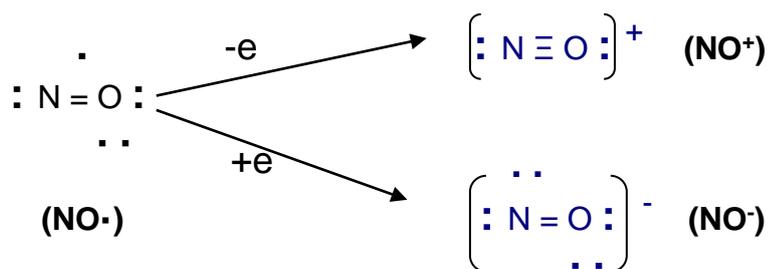


Figura 4.1. Estructura electrónica de los tres estados de oxidación del NO que muestran actividad biológica. El radical NO es rápidamente oxidado por la pérdida de un electrón dando el catión nitrosonio (NO⁺), o reducido por la adición de un electrón para formar el anión nitrosilo (NO⁻).

Las diferentes estructuras del NO poseen diferente reactividad y propiedades químicas, donde las más importantes se deben a la existencia de este electrón desapareado, que le permite mostrar una elevada reactividad hacia el O₂, el anión superóxido, los derivados del N y los metales de transición (Figura 4.2). El NO en disolución acuosa reacciona rápidamente con el O₂ para formar dióxido de nitrógeno (NO₂) que, a su vez, se descompone rápidamente en nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻). El NO también puede reaccionar con otras moléculas señal que se producen espacial y temporalmente junto al NO. Una de esas moléculas es el anión O₂⁻, que se produce en orgánulos como las mitocondrias y los cloroplastos, o por enzimas de membrana plasmática como las NADPH oxidasas (Neill y cols., 2002a,b). El anión O₂⁻ dismuta con facilidad para formar H₂O₂, especialmente a pH ácido, o en una reacción catalizada por la superóxido dismutasa. El producto de la reacción entre O₂⁻ y el NO (ó entre el H₂O₂ y el catión nitrosonio, NO⁺), es el peroxinitrito (ONOO⁻), molécula muy reactiva y destructiva. Esta interacción entre NO y las especies reactivas del O₂ se produce fundamentalmente, en las interacciones entre plantas y patógenos (Delledonne y cols., 2001).

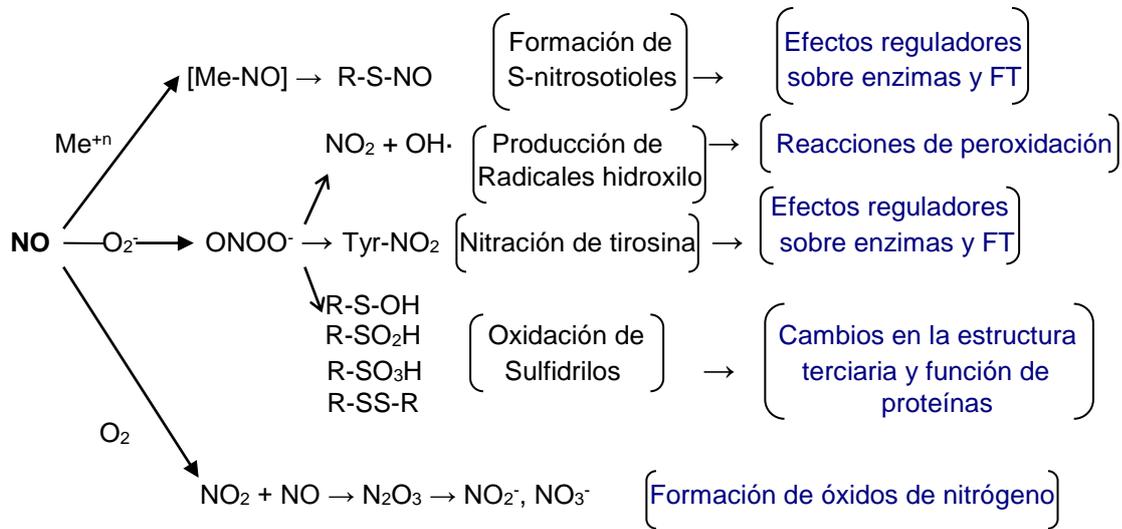


Figura 4.2. Reactividad del NO. En presencia de metales de transición (Me^{+n}), tales como Fe, Cu o Zn, el NO puede reaccionar dando lugar a la formación de complejos metal-nitrosilo que actúan sobre factores de transcripción (FT) o ciertas enzimas. El NO^+ y el $\text{NO}\cdot$ también pueden nitrosilar grupos tioles de las cisteínas de las proteínas (R-S-NO). El NO reacciona con superóxido (O_2^-) para formar peroxinitrito (ONOO^-), el cual puede conducir a la formación de NO_2 y el potente oxidante radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). El peroxinitrito puede producir la nitración de tirosinas (Tyr-NO_2) o la oxidación de residuos tioles a ácido sulfénico y sulfónico. En presencia de oxígeno, el NO se oxida a NO_2 , que reacciona con más moléculas de NO para dar N_2O_3 , formando una mezcla compleja de óxidos de nitrógeno.

El NO también interacciona con los grupos tiol de las proteínas y con proteínas que contienen metales de transición. La elevada reactividad de los grupos tioles explica la rápida formación de compuestos S-nitrosotioles (RS-NO). Por lo tanto, las proteínas que contienen grupos tioles o metales, necesarios para su actividad catalítica, son posibles dianas del NO y, por ello, posibles transductores de la función biológica de este radical. Entre estas proteínas diana se encuentran mensajeros celulares tales como los canales iónicos, las enzimas y los factores de transcripción.

IV.2. Propiedades anti-oxidantes y pro-oxidantes del NO

Desde su descubrimiento como radical libre, producido en el interior celular, esta molécula señal se ha considerado tanto citotóxica como citoprotectora (Beligni y Lamatina, 1999a,b; Stamler, 1992, 1994). Su efecto citoprotector se basa en la capacidad de regular el nivel y toxicidad de las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Halliwell y Gutteridge, 1984). De esta manera, el NO ejerce su acción protectora contra el estrés oxidativo producido por un aumento de la concentración de O_2^- , H_2O_2 o peróxidos de alquilo (Wink y cols., 1995).

La reacción de Fenton entre el H_2O_2 y los metales de transición produce el radical hidroxilo ($OH\cdot$). Este radical presenta la capacidad de oxidar a una extensa variedad de biomoléculas en un proceso característico de muchas enfermedades (Ames y cols., 1993). La presencia del NO puede atenuar el daño oxidativo producido por la reacción de Fenton, puesto que previene la formación de estos oxidantes al coordinar el hierro o reaccionar con el anión superóxido, limitando en gran medida la velocidad de formación del radical $OH\cdot$ (Beligni y Lamattina, 2001, 2002; Wink y cols., 1995). El NO también puede actuar como un antioxidante al romper la cadena de reacciones de peroxidación de los lípidos de las membranas (Hogg y cols., 1993; Rubbo y cols., 1994).

Los efectos citoprotectores del NO en plantas se han puesto de manifiesto especialmente bajo condiciones fuertemente oxidativas producidas por estreses bióticos y abióticos (Beligni y Lamattina, 2001, 2002). Así, se ha podido observar el efecto citoprotector del NO durante la explosión oxidativa a diferentes niveles de organización (cultivos celulares, tejidos, órganos e individuos) y el ejercido sobre moléculas como el ADN, el ARN, las proteínas, la clorofila y los lípidos (Beligni y Lamattina, 1999a,b, 2002).

La toxicidad del NO se debe principalmente a la reacción del NO con el anión O_2^- , que conduce a la formación de una molécula fuertemente oxidante, el $ONOO^-$. Este compuesto es capaz de oxidar los grupos tioles y los residuos de tirosina de las proteínas (Huie y Padmaja, 1993; Reiter y cols., 2000). La nitración de la tirosina evita su fosforilación si bien no se conocen las consecuencias funcionales de este proceso *in vivo*.

IV.3. Mecanismos de producción del NO en plantas

En las plantas, existen diferentes fuentes de NO (Figura 4.3; Tabla 4.1) y la importancia de la contribución de cada una de ellas depende de la especie, el tejido, las células, o las condiciones en las que crecen y, por supuesto, de la ruta de transducción de la señal que se está activando en cada momento. Existen evidencias de una producción de NO en plantas dependiente de enzimas como la óxido nítrico sintasa (NOS) y la nitrato reductasa (NR), así como otras fuentes de producción no enzimáticas.

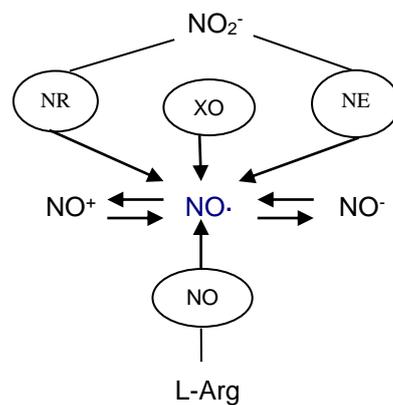


Figura 4.3. Posibles fuentes de producción del NO. En las plantas existen evidencias de varias fuentes potenciales de NO, incluyendo la NOS, la NR, la xantina oxidoreductasa (XO) y otras fuentes no enzimáticas (NE).

Tabla 4.1. Fuentes enzimáticas de NO en células vegetales.

Fuente	Referencia
Óxido nítrico sintasa (NOS)	Sen y Cheema (1995) Cueto y cols. (1996) Ninnemann y Maier (1996) Delledonne y cols. (1998) Durner y cols. (1998) Ribeiro y cols. (1999) Barroso y cols. (1999) Modolo y cols. (2002)
Proteína de Arabidopsis (AtNOS1)	Guo y cols. (2003)
Variante de la proteína P de la glicina descarboxilasa (iNOS vegetal)	Chandok y cols. (2003)
Nitrato reductasa	Yamasaki y cols. (1999)
Xantina oxidoreductasa	Millar y cols. (1998) Harrison (2002)
Peroxidasa	Boucher y cols. (1992b) Huang y cols. (2002)
Citocromo P450	Boucher y cols. (1992a) Mansuy y Boucher (2002)
Enzima desconocida unida a la membrana plasmática	Stöhr y cols. (2001)

Óxido nítrico sintasa

La NOS cataliza la formación del NO a partir de la L-arginina mediante una oxidación que requiere una transferencia de cinco electrones, y dando como producto la L-citrulina. En esta reacción se requiere O₂ y NADPH, donde, en primer lugar, la arginina se oxida a hidroxí-arginina y, posteriormente, tiene lugar la oxidación de esta a NO y L-citrulina (Furchgott, 1995). A partir de los datos obtenidos con la enzima caracterizada en animales, y utilizando anticuerpos frente a las distintas formas de NOS de animales, varios grupos de investigación han proporcionado evidencias de la existencia en plantas de proteínas similares a la NOS. Sin embargo, los datos inmunológicos que apoyan su presencia en plantas,

pueden deberse a falsos positivos (inmunoreactividad positiva) como ha sido puntualizado por Lo y cols. (2000).

Ninnemann y Maier (1996) mostraron, por primera vez, la presencia de actividad NOS en plantas a través de la producción de citrulina radiactiva a partir de L-arginina, utilizando como inhibidores los análogos de la L-arginina: N_G -nitro-L-arginina (L-NNA) y su ester metílico, la N_ω -nitro-L-arginina metil-ester (L-NAME). Ribeiro y cols. (1999) utilizaron una combinación de ensayos enzimáticos e inmunológicos para proporcionar evidencias de la presencia de proteínas similares a la NOS en maíz. Sin embargo, la determinación de la actividad NOS a través de la conversión de L-arginina en L-citrulina, y la sensibilidad de la producción de NO a inhibidores de la NOS, no son evidencias suficientemente fuertes para demostrar la existencia inequívoca de esta proteína en plantas, lo que hace necesario su purificación y la clonación de su gen.

Nitrato reductasa

La NR es una enzima citosólica que cataliza la reducción de NO_3^- a NO_2^- , en una reacción dependiente de NAD(P)H.

Klepper (1979) proporcionó la primera evidencia de una producción de NO dependiente de la actividad NR. En leguminosas, más tarde, Harper (1981) demostró la liberación de óxidos de nitrógeno (NO_x) por las hojas de soja durante ensayos *in situ* de la NR. Estudios posteriores han demostrado que un mutante deficiente en la actividad NR (denominado *nr1*) es incapaz de producir NO_x durante ensayos realizados *in vivo* (Nelson y cols., 1983). Wildt y cols. (1997) han descrito emisiones de NO en la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el girasol (*Helianthus annuum*), el maíz (*Zea mays*), la espinaca (*Spinacea oleracea*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y otras especies, sugiriendo que la capacidad de producción de NO no es un proceso restringido a la NR de leguminosas. En ensayos realizados *in vitro* y utilizando un electrodo de NO del tipo Clark, se ha demostrado que la NR del maíz cataliza la reducción del NO_2^- a NO en los rangos de pH fisiológico (Yamasaki y cols., 1999). Finalmente, la producción de NO en el

alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* está mediada por la NR (Sakihama y cols., 2002).

El problema que plantea la NR es explicar como esta enzima, esencial en la asimilación del N inorgánico, puede también participar en la síntesis de una molécula reguladora del desarrollo vegetal como es el NO, y que la regulación de ambos procesos esté coordinada en la planta. En primer lugar, la producción del NO por la NR es dependiente de la acumulación de NO_2^- , que en última instancia es el sustrato de la enzima (Rockel y cols., 2002). En condiciones normales, el nitrito producido en el citosol por la NR se transporta al cloroplasto e inmediatamente se reduce a ión amonio por la nitrito reductasa (NiR), ya que su acumulación en el citoplasma es altamente tóxica (Sinclair, 1987). Así, es lógico pensar que en plantas sanas, el NO_2^- producido por la NR sea inmediatamente reducido en el cloroplasto, no cabiendo esperar su acumulación en el citoplasma. Sin embargo, cuando el NO_2^- se acumula en el citoplasma, al reducirse o inhibirse la actividad fotosintética, o al exceder su velocidad de síntesis la velocidad de transporte al cloroplasto (Kleppler, 1979; Vaucheret y cols., 1992), puede tener lugar una producción de NO dependiente de la NR. Puesto que el NO es una molécula que difunde con facilidad a través de las membranas, y puede escapar libremente a la atmósfera, la producción del NO dependiente de la NR actuaría como válvula de escape para evitar la acumulación de la especie altamente tóxica, el NO_2^- , en el citoplasma bajo condiciones de estrés en las cuales este limitada la fotosíntesis, ya que la reducción del NO_2^- a NO por la NR requiere un electrón, mientras que la reducción del NO_2^- a NH_4^+ por la NiR requiere seis electrones.

Otras fuentes de producción

El NO puede generarse mediante la reducción enzimática o no enzimática de las formas inorgánicas del nitrógeno oxidado. Recientemente se ha demostrado que la xantinoxidasa (XO) es una enzima que produce NO (Harrison, 2002). De forma similar a la NR, la XO es una enzima redox que contiene molibdeno como cofactor y realiza la conversión del NO_2^- en NO (Millar y Day., 1997; Godber y

cols., 2000a). En presencia de O_2 , la XO produce también anión O_2^- . En presencia de tensiones de O_2 próximas a la anaerobiosis, se establece una competencia de las dos reacciones que producen tanto anión O_2^- como NO. El anión O_2^- puede posteriormente reaccionar con el NO para formar $ONOO^-$ (Godber y cols., 2000b), y así se ha sugerido que la producción de $ONOO^-$ actúa como un mecanismo antibacteriano en animales (Hancock y cols., 2002). Por lo tanto, en órganos vegetales como las raíces, esta enzima dispone del escenario idóneo para ser regulada en base a la tensión de O_2 . La actividad XO también se ha descrito en los peroxisomas vegetales (Corpas y cols., 2001). Sin embargo, el papel de esta enzima en las plantas no está claramente establecido, y se requieren nuevos datos que apoyen a la XO como fuente de producción de NO.

Las reacciones no enzimáticas que conducen a la formación del NO en las plantas necesitan ácido ascórbico (AA) y pH ácidos (pH 4.0) y podrían tener lugar en los espacios apoplásticos donde el AA se encuentra presente (Horemans y cols., 2000). Recientemente se ha demostrado que las células de la capa de aleurona de cebada generan un ambiente lo suficientemente ácido en el apoplasto para que se produzca la conversión de NO_2^- a NO utilizando el ascorbato como reductor (Bethke y cols., 2004).

Otra fuente no enzimática de producción del NO sería la conversión de NO_2^- a NO mediada por la luz y en presencia de los carotenoides (Cooney y cols., 1994). Esta reacción requiere un pH ácido, que sólo se da en determinados compartimentos subcelulares, como el apoplasto o la vacuola.

IV.4. Transducción de la señal del NO

En eucariotas no existe ninguna evidencia de la existencia de secuencias promotoras de genes que se unan o respondan directamente al NO (Bogdan, 2001). Es por ello, que el NO debe activar rutas de transducción de señales que producen cambios en la expresión génica a través de segundos mensajeros.

Tanto en células animales como vegetales, el GMP_c es aparentemente un componente importante de la transducción de la señal del NO (Arnold y cols., 1977; Durner y cols., 1998; Pfeiffer y cols., 1994; Stamler, 1994). El GMP_c (Figura 4.4) es una molécula señal, biológicamente activa, que actúa como segundo mensajero variando su concentración en respuesta a la presencia de ciertos estímulos externos. Así, el NO activa la producción de GMP_c ya que reacciona directamente con el hierro hemínico de la GC induciendo un cambio conformacional de la proteína que activa la síntesis de GMP_c (Hancock, 1997). Esta activación es transitoria y persiste sólo mientras el NO está presente, por lo que los efectos del NO se manifiestan en un espacio de tiempo relativamente corto, y la concentración de GMP_c vuelve pronto a sus niveles basales por la actuación de las fosfodiesterasas. Debido a que los niveles de GMP_c en las plantas son extraordinariamente bajos, su detección y cuantificación sólo ha sido posible mediante la espectrometría de masas y los radio-inmunoensayos (Penson y cols., 1996).

Como en células animales, el GMP_c parece actuar a través de la ADP ribosa cíclica (ADPR_c) que es una molécula bien caracterizada que actúa como segundo mensajero movilizando y liberando calcio desde el retículo endoplásmico y las vacuolas al citosol (Allen y cols., 1995; Leckie y cols., 1998a, b). En las células animales, la síntesis de ADPR_c es activada por el NO, en una acción mediada por el CMPC, que activa una proteín-quinasa (PK) dependiente de GMP_c (Wendehenne y cols., 2001). Sin embargo, esta PK no se ha podido aislar ni clonar hasta el momento.

A pesar de ello, la ADPR_c parece estar implicada en la regulación de las concentraciones de calcio en las células guarda en respuesta al ácido abscísico (ABA) (Leckie y cols., 1998). De hecho, el NO induce el cierre estomático ya que es un intermedio esencial de este proceso inducido por el ABA (García-Mata y Lamatina, 2002; Neill y cols., 2002a). Está bien establecido que la ruta de transducción de la señal mediada por el ABA en el cierre estomático es dependiente de calcio, aunque recientemente se han descrito algunas respuestas independientes de calcio (Webb y cols., 2001). Por ello, no es sorprendente que el cierre del estoma inducido por el NO requiera la liberación de calcio (García-Mata

y Lamatina, 2001). Este calcio intracelular que se libera puede tener dos orígenes diferentes: proceder de vesículas sensibles al inositol-trifosfato (IP_3) o bien de vesículas sensibles a la ADPRc.

Por otra parte, el NO puede actuar a través de una ruta independiente de GMP_c activando fosfatasa y PK, que incluyen a las PK activadas por mitógenos (MAPKs). De hecho, se ha identificado en tabaco una PK activada por el NO que presenta las características de una MAPK. En *Arabidopsis*, se han identificado 20 genes que codifican MAPKs. Estas MAPKs se clasifican en 4 grupos (A-D), siendo las del grupo A las más investigadas por su participación en respuestas a hormonas y señales medioambientales (Ichimura y cols., 2002). En este momento, no está claro si la activación de estas quinasas está mediada por el GMP_c .

La síntesis del NO y la transducción de su señal se encuentran también reguladas por las proteín-fosfatasa. De hecho, los tratamientos de suspensiones celulares de soja con cantaridina, un inhibidor de la proteín-fosfatasa 2A, produce un aumento de la síntesis de NO (Delledonne y cols., 1998). Sin embargo, la síntesis del NO mediada por la NR en espinacas se inhibe por cantaridina (Rockel y cols., 2002). En *Arabidopsis*, los mutantes insensibles al ABA, *abi1-1* y *abi2-1*, que presentan diferentes mutaciones en los genes de proteín-fosfatasa, sintetizan NO en respuesta al ABA pero, sin embargo, sus estomas son incapaces de cerrarse en respuesta al tratamiento con NO (Desikan y cols., 2002).

Por otra parte, Durner y cols., (1998) descubrieron una ruta de actuación del NO independiente de GMP_c que libera calcio al citosol durante la activación de los genes de defensa en tabaco. Aunque los efectos del NO independientes de GMP_c son bien conocidos, el mecanismo bioquímico a través del cuál se traduce la señal no se conoce por completo (Wendehenne y cols., 2001).

Debido a la reactividad química del NO, sus principales moléculas diana son proteínas que contienen metales de transición y las proteínas que contienen grupos tioles (Beligni y Lamatina, 2001; Bogdan, 2001; Wendehenne y cols., 2001). De manera similar a la interacción que realiza con la GC, el NO puede coordinar el hierro libre o el hierro hemínico que contienen ciertas proteínas con actividad catalítica. De esta manera, el NO inhibe la actividad aconitasa en

tabaco, una enzima que contiene un centro hierro-azufre, que cataliza la isomerización del citrato en isocitrato (Navarre y cols., 2000). El NO también inhibe a las enzimas catalasa y peroxidasa produciendo alteraciones importantes en los niveles de las ERO (Ferrer y Ros Barceló, 1999; Clarke y cols., 2000; Ros Barceló y cols., 2002).

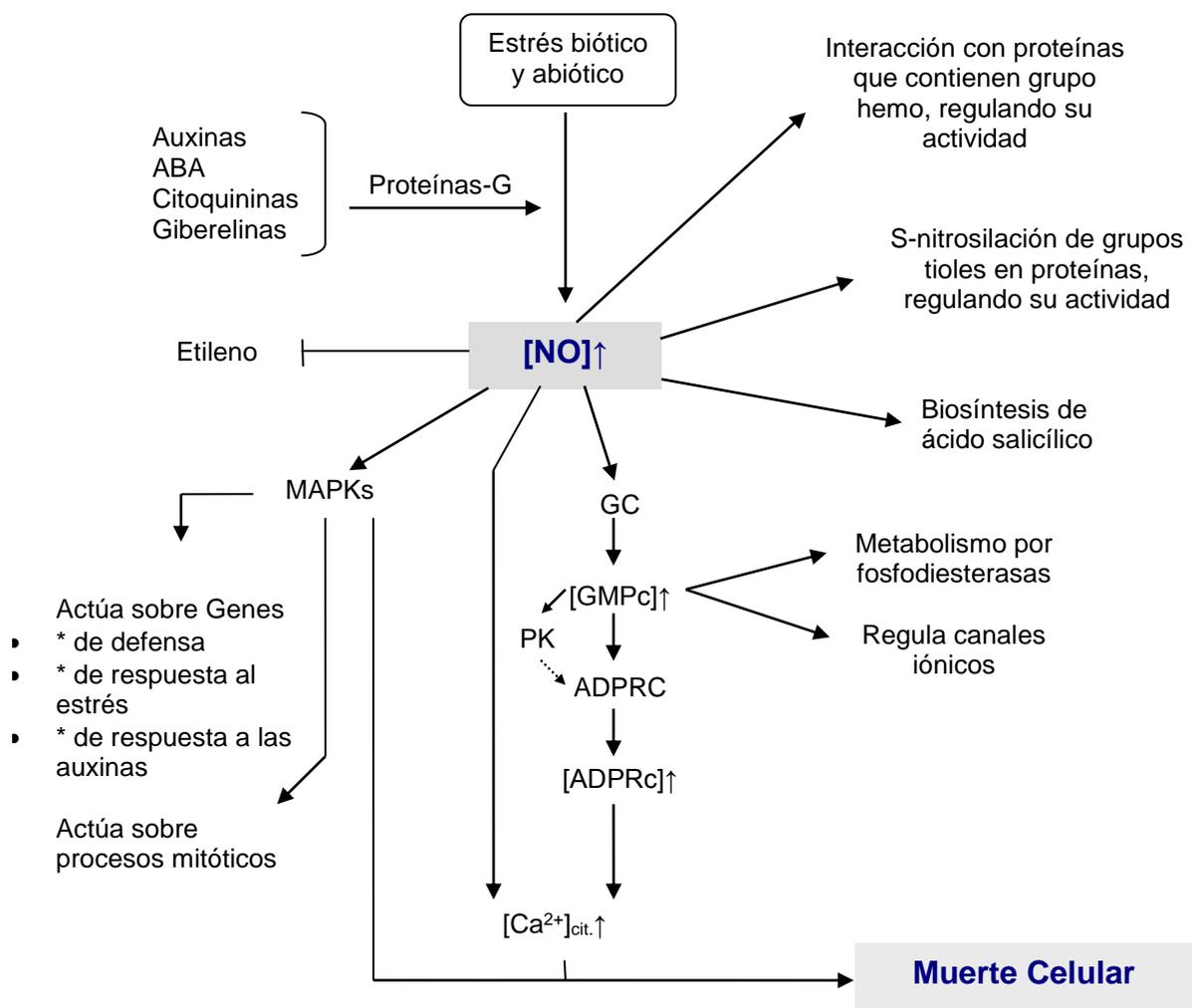


Figura 4.4. Cascada metabólica durante la transducción de la señal del NO.

Está bien establecido que el NO interacciona con los residuos de cisteína y tirosina de las proteínas. La modificación de los grupos tioles por ERO, como el H_2O_2 , está reconocido como un mecanismo transductor de la señal en plantas (Neill y cols., 2002b). Esto es debido a que los residuos tiólicos y los puentes disulfuro tienen una importancia especial en el mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína, de manera que esta modificación reversible afecta a la actividad de la proteína de manera análoga a la modificación de la proteína mediante la fosforilación reversible. Las S-nitrosilaciones de las proteínas y del glutatión también se producen *in vitro*. Sin embargo, hasta la fecha, no se han detectado proteínas S-nitrosiladas en plantas, a pesar del creciente desarrollo de las técnicas proteómicas. En estudios realizados en animales sí se han detectado proteínas S-nitrosiladas y se le han asignado una posible función biológica.

Por otra parte, el NO puede interactuar con otras rutas de transducción de señales, y de una manera directa con el O_2^- , para formar el anión $ONOO^-$. Muchos resultados experimentales indican que la generación de las ERO, en especial de H_2O_2 , parece ser un compañero común durante la generación de NO. Así, tanto las ERO como el NO se generan en respuesta a patógenos (Durner y Klessig, 1999), así como en las células guarda en respuesta al ABA (Neill y cols., 2002a). El H_2O_2 se produce en respuesta a muchos estímulos bióticos y abióticos, y es posible que el NO también se sintetice, y que las respuestas posteriores dependan, al menos en parte, de las interacciones entre ellos. Incluso se ha descrito que el H_2O_2 y el NO activa MAPKs y provoca cambios en la concentración intracelular de calcio.

IV.5. Funciones biológicas del NO en plantas

NO y hormonas

El NO actúa de mensajero de la acción hormonal, de manera similar al H_2O_2 , e incluso ciertas hormonas como las citoquininas inducen su síntesis (Figura 4.4) (Tun y cols., 2001, Piatelli y cols., 1969). Recientemente, Carimi y cols. (2002) han propuesto un papel para las citoquininas en la inducción de la muerte celular

programada (MCP) y, dado que el NO induce la MCP, es bastante probable que el NO actúe de mediador en este proceso inducido por las citoquininas. Por otra parte, las citoquininas actúan sinérgicamente con la luz y las giberelinas en el proceso de la germinación (Beligni y Lamattina, 2000).

El reciente descubrimiento del papel del NO en el cierre de los estomas inducido por el ABA representa un avance significativo en la investigación sobre los mecanismos de actuación del NO. El mecanismo de transducción de la señal en las células guarda es sumamente complejo pero la mayor parte de las señales de elicitación provocan cambios en la concentración del calcio en el citosol (Schroeder y cols., 2001). El aumento en el nivel de calcio esta mediado por mensajeros químicos tales como el IP₃, el H₂O₂ y la ADPRc, entre otros. Schroeder y cols. (2001) han identificado nuevas facetas de la transducción de la señal del ABA en las células guarda, como son la liberación de calcio mediada por el H₂O₂, la participación de proteínas G (Wang y cols., 2001), y el papel de la fosforilación de proteínas (Li y cols., 2002).

El etileno y el NO también se encuentran relacionados en los procesos de maduración y senescencia de los tejidos vegetales (Figura 4.4) (Leshem y cols., 1998). Así, cuando se aplica NO exógeno se prolonga la frescura de los productos hortícolas, hecho que es debido a la inhibición de la producción de etileno (Siegel-Itzcovich, 1999). Por otro lado, la senescencia se caracteriza por la pérdida de agua y la desecación de la planta. Como se ha descrito anteriormente, el NO puede regular el cierre estomático modulando los canales iónicos y los niveles de Ca⁺² en las células guarda. Por tanto, la disminución de los niveles de NO en los tejidos senescentes puede provocar una pérdida de la eficacia en la regulación del cierre del estoma, causando importantes pérdidas de agua que contribuyen a la deshidratación irreversible de la planta.

Finalmente, se ha descrito que las auxinas inducen la síntesis de NO en raíces de pepino y tomate (Pagnussat y cols., 2002). En este caso, el NO induce el crecimiento de la raíz y la formación de raíces laterales.

NO y estrés abiótico

Está bien establecido que los diferentes estreses abióticos (Figura 4), como la sequía, las bajas y altas temperaturas, la radiación UV y la exposición al ozono, inducen la generación de las ERO. Las ERO inician los procesos oxidativos pero también inducen varias cascadas metabólicas (Neill y cols., 2002b; Vranova y cols., 2002), por lo que el mantenimiento de niveles apropiados de ERO es una respuesta de supervivencia. De hecho, el NO interacciona con las ERO de diferentes maneras, realizando una función antioxidante frente a algunos estreses oxidativos (Beligni y Lamatina, 1999a, b). La regulación por el NO de la formación de O_2^- (Caro y Puntarulo, 1998) y la inhibición de la peroxidación de los lípidos (Boveris y cols., 2000) también muestran su función antioxidante. Por otro lado, un exceso de NO provoca un aumento de especies tóxicas de nitrógeno, por lo que es sumamente importante la existencia de un balance equilibrado de las ERO y NO.

El estrés por sequía es uno de los principales problemas medioambientales que restringe enormemente la productividad de los cultivos, por lo que el conocimiento de los procesos celulares que minimizan los problemas derivados de la sequía es especialmente importante. El ABA se sintetiza cuando se produce una pérdida de turgor en las células guarda y, como se ha descrito anteriormente, estimula la síntesis del NO. La aplicación de donadores de NO disminuye la apertura estomática y reduce la transpiración, y es probable que el NO no actúe sólo sino que interaccione con otras moléculas señal como se ha sugerido anteriormente. De hecho, la actividad NADPH oxidasa (generadora de O_2^-) se induce por el ABA durante la sequía, y conduce a un aumento de los niveles de las ERO en maíz, por lo que, aparentemente, existe una estrecha relación entre los niveles de ABA, ERO y NO (Jiang y Zhang, 2002). La utilización de mutantes ayudará a elucidar esta compleja interacción.

Las respuestas del NO a otros estreses como el calor y la congelación también han sido objeto de estudio. Así, la aplicación de NO aumenta la resistencia a la congelación en el tomate, el trigo y el maíz (Lamattina y cols., 2001). Este efecto se manifiesta a través de propiedades antioxidantes del NO,

que conlleva una disminución de los niveles de las ERO que se acumulan debido a la exposición de los vegetales al frío o al calor (Neill y cols., 2002b).

Otro agente abiótico que interacciona con el NO es el ozono. Los tratamientos de plantas de *Arabidopsis* con ozono inducen la actividad NOS que precede a la acumulación de ácido salicílico y la muerte celular (Rao y Davis, 2001). De hecho, en tabaco, el NO induce la síntesis de ácido salicílico (Durner y cols., 1998).

El daño por heridas es aprovechado por los patógenos, y por tanto, las plantas generan y acumulan NO y H₂O₂ (Delledonne y cols., 1998). Orozco-Cárdenas y Ryan (2002) demostraron que aunque el daño por heridas no induce la generación de NO, el tratamiento con donadores de NO inhibe la expresión de genes específicos inducidos por las heridas.

NO e interacciones bióticas

La publicación de dos artículos en 1998 que describían la función del NO en las rutas de transducción de los mecanismos de defensa de las plantas (Delledonne y cols., 1998; Durner y cols., 1998) ha conducido a un incremento incesante de investigaciones sobre esta molécula señal en los mecanismos de defensa. El NO actúa como molécula señal durante la inducción de la respuesta hipersensible (RH), proceso de defensa que se activa en las plantas en la respuesta incompatible. Asociado a la RH se encuentra la explosión oxidativa, que se manifiesta en la generación abrupta de las ERO, la MCP y la activación de ciertas rutas metabólicas que conducen a la expresión de ciertos genes relacionados con la resistencia. Esta respuesta está asociada con la muerte celular localizada en el lugar de la infección, que limita la disponibilidad de nutrientes y, de esta manera, el crecimiento y la expansión del agente invasor.

El NO induce la síntesis de ácido salicílico, molécula señal implicada en el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (RSA) (Draper, 1997). Dado que el tratamiento con ácido salicílico produce un aumento de NO, es bastante probable que exista una estrecha relación en el proceso de transducción de la señal entre los niveles de H₂O₂, los niveles de NO y los niveles de ácido salicílico durante la RH y la RSA (Van Camp y cols., 1998; Song y Goodman, 2001).

La acumulación de fitoalexinas es otro de los fenómenos asociados a la RH. Recientemente, Modolo y cols. (2002) han descrito la participación del NO endógeno en la inducción de la biosíntesis de fitoalexinas en cotiledones de soja. Esta formación de fitoalexinas se inhibe en presencia de inhibidores de la NOS, hecho que sugiere la participación de la NOS en la producción de NO.

NO y muerte celular programada

La MCP es un proceso celular determinado genéticamente y dirigido metabólicamente hacia el suicidio celular, en el que las células mueren debido más a la activación de los procesos de ejecución y transducción de las señales que por la necrosis inducida por los diferentes tipos de daño.

La muerte celular inducida por el NO (Figura 4) posee las características de la MCP, tales como la condensación de la cromatina, el requerimiento de la expresión génica, y la activación de una cascada de caspasas. Aunque no existen evidencias de la existencia de caspasas en plantas, una función similar a ella pueden desarrollarla las meta-caspasas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Delledonne y cols., (2001) demostraron que el balance entre los niveles de NO y las ERO determina el que se produzca o no la MCP. El NO por sí sólo no induce la MCP en cultivos celulares de soja pero sí a través de la interacción con H₂O₂. Si los niveles de O₂⁻ son más elevados que los de NO, éste reacciona con el O₂⁻ para formar ONOO⁻, y no se produce la MCP. Por el contrario, si se produce más NO que O₂⁻, el NO reaccionará con el H₂O₂ (formado por dismutación del anión O₂⁻) y se induce la muerte celular.

De Pinto y cols. (2002a, b) han demostrado la estrecha relación existente entre los niveles de NO, H₂O₂ y antioxidantes durante la inducción de la MCP. Así, cultivos celulares de tabaco BY-2 tratados separadamente con NO y H₂O₂ no sufren MCP. Sin embargo, el tratamiento conjunto con H₂O₂ y NO provocó un aumento significativo de la muerte celular, con todas las características de la MCP, y un aumento de la actividad PAL.

IV.6. Efecto del NO sobre las peroxididasas

Esta bien establecido que el NO se une de manera reversible al grupo prostético de las hemoproteínas vegetales y, entre ellas, a las peroxididasas (Yonetani y cols., 1972; Ascenzi y cols., 1989). Los estudios de resonancia paramagnética electrónica (RPE) y óptica han sido concluyentes en la naturaleza de estos complejos (Figura 4.5) que difieren en su espectro de absorción (López-Molina y cols., 2003), mostrando la banda Soret ($\lambda = 405$ nm) un desplazamiento a 419 nm, y las bandas de absorción α y β ($\lambda = 495$ y 636 nm) un desplazamiento a 533 y 568 nm, respectivamente.

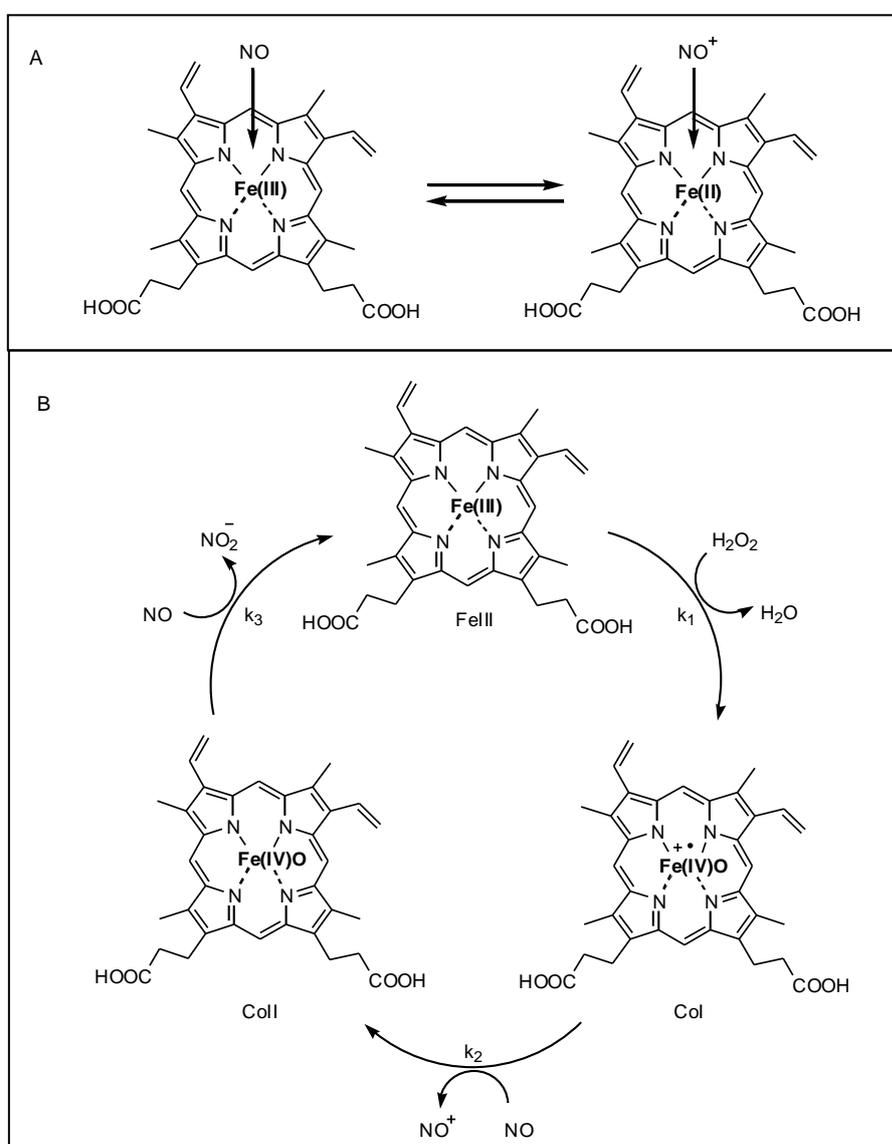
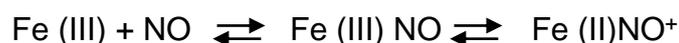


Figura 4.5. A. Complejo formado por la unión del NO al grupo prostético IX de la protoporfirina IX de las peroxidasas vegetales. **B.** Ciclo catalítico de las peroxidasas vegetales en presencia de NO, actuando como inhibidor competitivo de la enzima.

La formación de estos complejos nitroso-ferrosos $[\text{Fe(II)NO}^+]$ retira intermedios enzimáticos del ciclo catalítico, entre ellos la forma férrica de la enzima,



por lo que el NO inhibe las reacciones catalizadas por la peroxidasa con una constante de inhibición (K_i) en el rango de μM (Ischinopoulos y cols., 1996; Ferrer y Ros Barceló, 1999).

De esta manera, donadores de NO como el nitroprusiato sódico (NPS) inhiben la actividad peroxidasa (Ferrer y Ros Barceló, 1999; de Pinto y cols., 2002a, b) y este efecto se revierte por atrapadores de NO como el 2-fenil-4,4,5,5-tetrametil-imidazolona-1-oxilo (PTIO).

Los ensayos histoquímicos han confirmado que el efecto del NO sobre las peroxidasas puede extrapolarse al de las peroxidasas implicadas en la síntesis de ligninas ya que estas proteínas, localizadas en los tejidos lignificantes, también se inhiben en presencia de donadores de NO como el NPS, siendo este efecto también revertido por el PTIO (Figura 4.6).

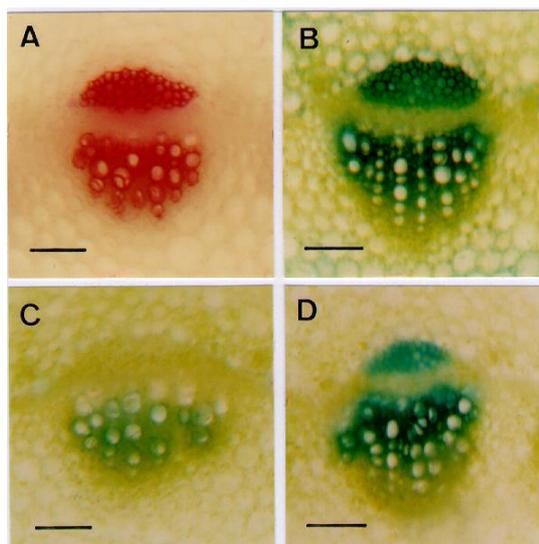


Figura 4.6. Efecto del NPS sobre la actividad peroxidasa del xilema de *Z. elegans*. A: sección teñida con floroglucinol. B: control teñido con 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina. C: sección preincubada durante 20 min con 5 mM NPS. D: sección preincubada durante 20 min con 150 μ M de PTIO, a la que se le añadió posteriormente 5 mM de NPS. Barras = 100 μ M. Tomado de Ros Barceló y cols. (2002).

IV.7. Detoxificación de NO

Ya que el NO es un buen sustrato de las peroxidasas, la peroxidasa puede jugar un importante papel en los procesos de detoxificación del NO en los tejidos vegetales. De hecho, el NO reacciona con el Co I de la enzima con una constante de velocidad de $7.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, reacción en la que se forma el catión nitrosonio, NO^+ (Figura 4.7). Curiosamente, la constante de la reacción de Co II con el NO es mayor que la constante de la reacción de Co I con NO, que suele considerarse como la reacción más rápida. Este hecho significa que, en presencia de débiles donadores de electrones del Co II, como son los catecoles (Nappi y Vass, 2001), o el guayacol (Uchida y cols., 2002; Hung y cols., 2002), que muestran valores de k_3 de $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente, el NO puede activar la actividad peroxidasa frente a estos sustratos al activar el paso de la formación de la forma férrica de la enzima a partir de Co II. De esta forma, los efectos activadores o inhibidores del NO sobre la actividad peroxidasa dependerán de los valores relativos de k_3 frente al sustrato fenólico y frente al NO. El producto inicial de la

oxidación del NO por el Co II parece ser el anión NO_2^- que posteriormente se oxida produciendo la forma radical NO_2^\cdot (Shibata y cols., 1995; van der Vliet y cols., 1997).

Las peroxidasa vegetales son también capaces de oxidar al aminoácido tirosina (Tyr) de ciertas proteínas tanto vegetales como animales, dando lugar al radical tirosilo (Tyr^\cdot , Figura 15, 1) que se combina con otro radical Tyr^\cdot para formar la isoditirosina (Michon y cols., 1997). Cuando la oxidación de la Tyr por la peroxidasa se lleva a cabo en presencia de NO_2^- , se forma una mezcla de los radicales Tyr^\cdot y NO_2^\cdot en el medio de reacción, que se acoplan para producir la 3-nitro-tirosina (Figura 4.7, 2) (van der Vliet y cols., 1997). La 3-nitro-tirosina es un conocido marcador del daño oxidativo provocado sobre las proteínas animales, pero no existen evidencias de tal modificación de los residuos de Tyr en proteínas vegetales.

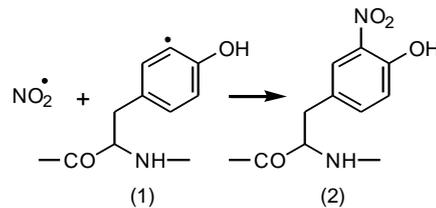
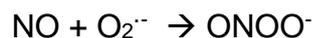


Figura 4.7. Acoplamiento del radical NO_2^\cdot y del radical de la tirosina (1), para producir la 3-nitro-tirosina (2).

Los tejidos vegetales son capaces de sostener tanto una producción de NO como de anión superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Ogawa y cols, 1997; Ros Barceló 1998, 1999). Por lo tanto, es probable que en estos tejidos ambos radicales reaccionen produciendo el anión peroxinitrito:



Este anión se forma a una velocidad controlada por difusión ($k = 6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y su formación parece desempeñar un papel muy importante en los procesos de citotoxicidad que conducen a la MCP (Wendehenne y cols., 2001;

Delledonne y cols., 2001), si bien su función real durante este proceso ha sido sometida a discusión (Fukuto y Ignaro, 1997).

Independientemente de su función en las células vegetales, el peroxinitrito puede considerarse como un sustrato de las peroxidasas vegetales (Floris y cols., 1993; Gebicka y Gebicki, 2000). De hecho, este anión reacciona con la forma férrica de la enzima para producir directamente Co II ($k_1 = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Floris y cols., 1993), dando como producto la especie nitrosilante, NO_2^- :



El Co II no reacciona con el peroxinitrito, de forma que la reducción de CoII sólo puede tener lugar en presencia de un donador externo de electrones, como cualquier fenol. Una vez que se conocieron estos hechos, Grace y cols. (1998) propusieron que el sistema peroxidasa/ácido clorogénico podría actuar como un ciclo de detoxificación del peroxinitrito en el cuál podría ser funcional cualquier otro fenol.

IV.8. Rutas mediadas por peroxidasa que sintetizan NO

La peroxidasa no sólo podría participar en la detoxificación de los diferentes óxidos de nitrógeno sino que también podría participar en rutas alternativas que conducen a su síntesis.

Las peroxidasas oxidan las *N*-hidroxiguanidinas (Figura 4.8, 2b) liberando NO, y obteniéndose los mismos productos que los producidos durante la reacción catalizada por la NOS (Xian y cols., 2001; Cai y cols, 2002). La capacidad de las peroxidasas vegetales para sintetizar NO no se encuentra restringida a la oxidación de las *N*-hidroxiguanidinas, ya que la oxidación de las *N*-hidroxi-*N*-nitrosaminas (Alston y cols., 1985), como el cupferron (Figura 16, 3b) (un xenobiótico), o la alanosina (una droga antineoplástica natural similar al ácido aspártico), también produce NO como producto colateral de la reacción.

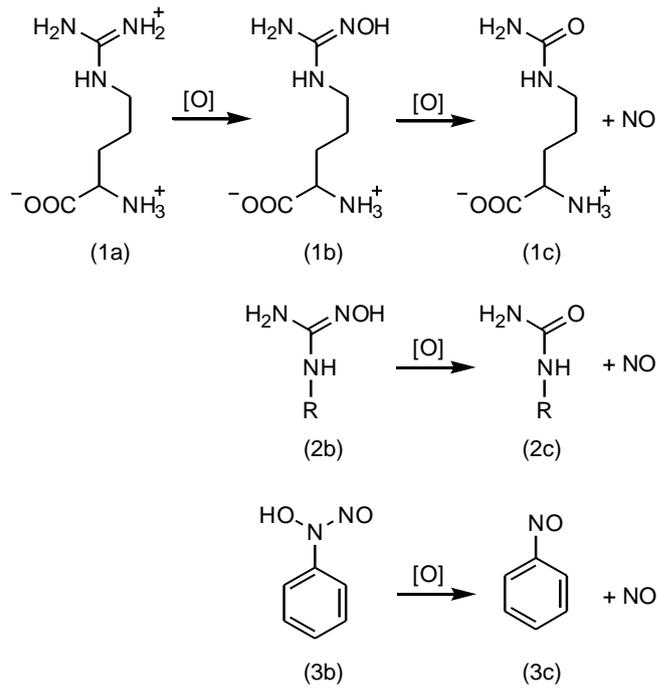


Figura 4.8. Las NOS catalizan la conversión de la L-arginina (1a) en la L-citrulina (1c) produciendo NO. En esta reacción, la *N*-hidroxi-L-arginina (1b), una *N*-hidroxiguanidina, actúa como intermediario. La oxidación catalizada por las peroxidasas de las *N*-hidroxiguanidinas (2b) produce también NO. La oxidación de *N*-hidroxinitrosaminas, tales como el cupferrón (3b), catalizada por las peroxidasas también produce NO.

Capítulo 1: Caracterización molecular y funcional de la peroxidasa fuertemente básica de *Zinnia elegans*

1. **Basic Peroxidases: The Gateway for lignin evolution?**. *Phytochemistry Reviews*. 2004.
2. ***In vitro* Cell Culture Systems of *Zinnia elegans***. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Vol II*. 2006.
3. **Cloning and Molecular Characterization of the Basic Peroxidase Isoenzyme from *Zinnia elegans*, an Enzyme Involved in Lignin Biosynthesis**. *Plant Physiology*. 2005.
4. **Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspensión cell cultures**. *Febs Letters*. 2006.
5. **Post-translational modifications of the basic peroxydase isoenzyme from *Zinnia elegans***. *Plant Molecular Biology*. 2007.
6. **Structural motifs of syringyl peroxidase predate not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes**. *New Phytologist*. 2007.

Capítulo 2: Regulación de la peroxidasa fuertemente básica de *Zinnia elegans* por el óxido nítrico en el proceso de lignificación

7. **Nitric Oxide, Peroxidase and Lignification in Higher Plants**. *Nitric Oxide Signaling in Higher Plants*. 2004.
8. **Nitric Oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans***. *New Phytologist*. 2005.

Anexo:

9. **Two distinct cell sources of H₂O₂ in the lignifying *Zinnia elegans* cell culture system**. *Protoplasma*. 2006.
10. **The promoter región of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains cis-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide**. *Planta*. 2012.
- 11.

Capítulo 1: Caracterización molecular, bioquímica y funcional de la peroxidasa fuertemente básica de *Zinnia elegans*

1. Basic Peroxidases: The Gateway for lignin evolution?- *Phytochemistry Reviews*. 2004
2. *In vitro* Cell Culture Systems of *Zinnia elegans*. – *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Vol II*. 2006
3. Cloning and Molecular Characterization of the Basic Peroxidase Isoenzyme from *Zinnia elegans*, an Enzyme Involved in Lignin Biosynthesis. *Plant Physiology*. 2005
4. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspensión cell cultures. *Febs Letters*. 2006
5. Post-translational modifications of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology*. 2007
6. Structural motifs of syringyl peroxidase predate not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. *New Phytologist*. 2007

El proceso de lignificación de la pared celular de las plantas vasculares ha sido objeto de numerosos estudios tanto fundamentales como aplicados. El estudio que se ha realizado en esta Memoria presenta como objetivo fundamental el estudio de los fundamentos básicos de la lignificación utilizando una planta modelo como es *Zinnia elegans*, a través de la caracterización molecular, bioquímica y funcional de la proteína responsable de la polimerización de los alcoholes cinamílicos precursores de las ligninas. Aunque la lignificación de las plantas vasculares terrestres supuso un paso decisivo en la evolución de éstas, la formación de este polímero de ligninas restringe la utilización y el aprovechamiento de las plantas. De hecho, la fuerte lignificación que experimenta la madera dificulta y encarece las labores de la industria papelera, aumentando, al mismo tiempo, el nivel de los residuos tóxicos indeseables por la contaminación ambiental que supone su extracción. La lignificación también disminuye la calidad nutritiva de las plantas que se utilizan como forraje al reducir su digestibilidad y su utilidad como alimentos. Por lo tanto, a pesar de que la lignificación es un proceso vital para la supervivencia de las plantas terrestres es también un factor indeseable durante el procesado de ciertas hortalizas, como los espárragos y las alcachofas, para las industrias agroalimentarias ya que les confiere una dureza por el alto contenido en fibra a los productos manufacturados.

En los últimos años, se han estudiado los factores que determinan el proceso de lignificación mediante la utilización de nuevas herramientas biotecnológicas y desde diferentes puntos de vista. Así, las técnicas de manipulación genética de ciertas enzimas de la ruta de biosíntesis de las ligninas, como la O-metil-transferasa, la cinamoil-CoA reductasa y la alcohol cinamílico deshidrogenasa, han permitido obtener plantas con un contenido menor o una composición de ligninas diferente que facilita las labores de la industria papelera y aumenta la calidad nutritiva de las plantas utilizadas como forrajes. Sin embargo, los resultados prácticos obtenidos en la mejora de estas especies de interés aplicado han sido inferiores a las expectativas generadas en un principio, probablemente debido a que los sistemas enzimáticos elegidos como diana en el proceso de manipulación genética no eran los más adecuados.

Por ello, en esta Tesis nos hemos centrado en la peroxidasa ya que esta enzima no es sólo la responsable de la polimerización de los alcoholes cinamílicos sino también es la que controla, a través de las relaciones enzima/sustrato, el grado de polimerización de las ligninas, la relación entre la fracción lineal y la fracción condensada y la extensión en la que es incorporado cada monómero, siendo éstos, los tres factores claves que, en última instancia, determinan la rigidez y la digestibilidad de las paredes celulares vegetales lignificadas.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la realización de una caracterización molecular, bioquímica y funcional de la enzima responsable del proceso de lignificación en *Z. elegans* podría abrir las puertas a una posible manipulación genética más dirigida y efectiva de las ligninas de las paredes celulares vegetales. Éste es el objetivo principal de la presente Memoria ya que el estudio realizado en esta Tesis podría ser aplicable y ampliable a especies de interés en la industria papelera, en la producción de pastos y forrajes, o en la industria agroalimentaria puesto que se podrían determinar, en estas especies vegetales, las proteínas y genes homólogos diana para su posterior manipulación genética.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos y actividades:

1.- Purificación a homogeneidad de la peroxidasa básica de *Z. elegans*, utilizando como fuente de material proteico, el medio de cultivo de suspensiones celulares de *Z. elegans* ya que éste representa el proteoma extracelular. El proceso de purificación establecido en cuatro etapas incluye cromatografía de adsorción, de exclusión molecular, de intercambio catiónico y de afinidad. La pureza de la proteína se determinará por IEF, SDS-PAGE y por los espectros de absorción.

2. Obtención de anticuerpos de conejo específicos frente a dicha proteína, a través de los métodos convencionales descritos en la bibliografía.

La especificidad de los anticuerpos se comprobará mediante Western-blot de la proteína separada por IEF, PAGE-catiónica y SDS-PAGE.

3.- Caracterización molecular de las dos isoformas de la proteína por sus características espectrales, obtención de la secuencia amino acídica del extremo N-terminal de la proteína mediante degradación de Edman (microsecuenciación). Además, las dos isoformas de la proteína resueltas por SDS-PAGE serán digeridas con tripsina y los espectros de masas de los péptidos se caracterizarán en base a su relación masa/carga (m/z) mediante MALDI-TOF MS. Los fragmentos trípticos se analizarán mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-nLC) utilizando un espectro de masas de trampa iónica (ESI-IT-MS) y el motor de búsqueda en base de datos Mascot.

4. Clonaje y secuenciación completa del cDNA y amplificación de la región que codifica para los dos isoenzimas de la peroxidasa de *Z. elegans*. La secuencia completa del cDNA se obtendrá a partir del RNA total, aislado de hipocotilos de 6 días de *Z. elegans*, por reacción con transcriptasa reversa (RT-PCR) utilizando cebadores degenerados y específicos cuyas secuencias nucleotídicas se diseñarán en base a la complementariedad de la hebra codificante para los fragmentos pépticos presentes en la secuencia carboxi- y amino-terminal de ambas isoformas de la proteína. La secuencia completa del cDNA incluyendo el péptido señal y las regiones flanqueantes 5' y 3' se obtendrán por 5'-RACE y 3'-RACE. Una vez obtenido este cDNA se amplificará por PCR el fragmento codificante para la peroxidasa de *Z. elegans* con los cebadores previamente diseñados. El fragmento amplificado se purificará por electroforesis en geles de agarosa y se enviará a un servicio externo para su secuenciación, pudiendo así verificar la secuencia obtenida con la deducida a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína.

5. Extracción del DNA total y amplificación del gen de la peroxidasa básica de *Z. elegans*. El DNA total se extraerá utilizando los métodos convencionales y utilizando los cebadores diseñados, se amplificará y se secuenciará el gen completo de la peroxidasa determinándose el número y posición de los posibles intrones.

6. Caracterización funcional de la peroxidasa básica purificada. Para ello se realizarán estudios cinéticos de la enzima con diferentes sustratos fisiológicos característicos por su presencia en los polímeros de lignina (alcoholes y aldehídos hidroxicinámicos).

7. Aislamiento y caracterización de las paredes celulares mediante tioacidolisis y oxidación alcalina con nitrobenceno para elucidar tanto la composición de monómeros de lignina mediante la obtención de estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los radicales p-cumarilo y coniferilo y las que derivan del alcohol sinapílico así como la relación de unidades hidroxilo/guayacilo/siringilo.

Los resultados y conclusiones más relevantes de este Capítulo se resumen a continuación:

El proceso de purificación de las dos isoformas de peroxidasa de naturaleza fuertemente básica de *Z. elegans* se realizó en cuatro etapas que incluyeron una cromatografía de interacción hidrofóbica seguida de una de exclusión molecular y, a continuación una cromatografía de intercambio iónico. Dada la naturaleza glicoproteica de estas isoenzimas de peroxidasa, el último paso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad sobre Concanavalina A donde se obtuvieron dos fracciones de peroxidasas que se caracterizaban por su diferente patrón de glicosilación. Ambas isoformas mostraron máximos de absorción a 403 (banda Soret), 500 y 640 nm lo que sugería que se trataba de peroxidasas secretoras de clase III de Fe^{3+} de alto spín.

En cuanto a su caracterización molecular, las dos peroxidasas contenían una misma secuencia de aminoácidos en el extremo amino-terminal. Los resultados obtenidos de las digestiones trípticas de ambas peroxidasas apoyaban su homología ya que se obtuvieron huellas peptídicas idénticas. La caracterización de los fragmentos trípticos en la trampa iónica reveló coincidencias de secuencias con peroxidasas que se expresaban en la diferenciación del elemento traqueal durante su lignificación.

En relación a sus constantes catalíticas (K_{cat}) y los valores de sus constantes de Michaelis aparentes (K_m) para los tres alcoholes hidroxicinámicos se observó que mostraban una mayor afinidad por el alcohol sinapílico. En este sentido, la reactividad de estas proteínas por el alcohol sinapílico fue tan elevada que la oxidación de este alcohol proporcionó productos de oxidación de naturaleza oligomérica de masa y grado de polimerización elevada. Los resultados más relevantes de los experimentos de suministro de sustratos a suspensiones celulares de *Z. elegans*, concretamente de H_2O_2 y de H_2O_2 en combinación con alcohol sinapílico sugieren que una de las etapas limitantes de la lignificación en las suspensiones celulares, es decir la formación de monómeros unidos β -O-4 derivados de los alcoholes coniferílico y sinapílico, es la disponibilidad del H_2O_2 puesto que se incrementa su cantidad total (455%); sin embargo, la adición conjunta de H_2O_2 y alcohol sinapílico no aumenta más la cantidad total de dichos monómeros (351%) lo que indica que la lignificación de la pared celular en los cultivos celulares de *Z. elegans* no solamente esta controlada por la velocidad de suministro de H_2O_2 sino también por la limitación de espacio para el acoplamiento cruzado de los monolignoles β -O-4 en las paredes celulares por lo que el crecimiento lineal de la macromolécula de lignina no es infinito.

Por otra parte, mediante Western blots utilizando los anticuerpos específicos frente a estas proteínas se demostró que la isoforma de peroxidasa de masa molecular 33.44 se expresaba en elementos traqueales, raíces e hipocotilos mientras que la otra isoforma de masa molecular 34.70 únicamente se expresaba en raíces e hipocotilos jóvenes y ninguna de las dos isoformas se expresó en hojas y cotiledones.

Como resultado de la búsqueda de homologías en motivos estructurales de las peroxidasas de tipo siringilo característicos de las plantas angiospermas, se observó que éstas no sólo se encuentran en las peroxidasas de gimnospermas basales, en helechos y licopodios y en traqueófitas, sino que también se localizan en las peroxidasas de musgos como *Physcomitrella patens* y en hepáticas como *Marchantia polymorpha* que, como es típico de briofitas, no tienen tejido xilemático ni ligninas.

Capítulo 1: Caracterización molecular, bioquímica y funcional de la peroxidasa fuertemente básica de *Zinnia elegans*

Índice de artículos:

1. **Autores** (p.o. de firma): A. Ros Barceló, L. V. Gómez Ros, **C. Gabaldón**, M. López-Serrano, F. Pomar, J.S. Carrión and M.A. Pedreño.

Título: Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution?

Revista: *Phytochemistry Reviews*

Clave: R Volumen: 3 Páginas, inicial: 61 final: 78 Fecha: 2004

Lugar de publicación: Holanda

Contribución del doctorando: En esta revisión el doctorando realizó la búsqueda bibliográfica, participó en la realización de las figuras y en la preparación del manuscrito.

Abstract

Lignins are cell wall phenolic heteropolymers which result from the oxidative coupling of three monolignols, *p*coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohol, in a reaction mediated by peroxidases. The most distinctive variation in the monomer composition of lignins in vascular plants is that found between the two main groups of seed plants. Thus, while gymnosperms lignins are typically composed of G units, with a minor proportion of H units, angiosperms lignins are largely composed of similar levels of G and S units. The presence of S units in angiosperm lignins raises certain concerns in relation with the step of lignin assembly due to the inability of most peroxidases to oxidize syringyl moieties. *Zinnia elegans* is currently used as a model for lignification studies: – first because of the simplicity and duality of the lignification pattern shown by hypocotyls and stems, in which hypocotyl lignins are typical of angiosperms, while young stem lignins partially resemble those occurring in gymnosperms. Secondly, because of the nature of the peroxidase isoenzyme complement, which is almost completely restricted to the presence of a basic peroxidase isoenzyme, which is capable of oxidizing both coniferyl and sinapyl alcohol, as well as both coniferyl and sinapyl aldehyde. In fact, the versatility of this enzyme is such that the substrate preference covers the three *p*-hydroxybenzaldehydes and the three *p*-hydroxycinnamic acids. The basic pl nature of this peroxidase is not an exceptional frame point in this system since basic peroxidases are differentially expressed during lignification in other model systems, show unusual and unique biochemical properties as regards the oxidation of syringyl moieties, and their down-regulation in transgenic plants leads to a reduction in lignin (G+S) levels. Basic peroxidase isoenzymes capable of oxidizing syringyl moieties are already present in basal gymnosperms, an observation that supports the idea that these enzymes were probably present in an ancestral plant species, pre-dating the early radiation of seed plants. It also suggests that the evolutionary gain of the monolignol branch which leads to the biosynthesis of sinapyl alcohol, and of course to syringyl lignins, was not only possible but also favored because the enzymes responsible for its polymerization had evolved previously. In this scenario, it is not surprising that these enzymes responsible for lignin construction appeared early in the evolution of land plants, and have been largely conserved during plant evolution.

<http://link.springer.com/journal/11101>

2. **Autores** (p.o. de firma): M.A. Pedreño, **C. Gabaldón**, L.V. Gómez-Ros and A. Ros Barceló.

Título: *In vitro* cell culture systems of *Zinnia elegans*

Libro: **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues**

Clave: **CL** Volumen:II Páginas, inicial: 450 final: 457 Fecha: 2006

Editorial (si libro): Global Science Books

Lugar de publicación: Inglaterra

Contribución del doctorando: En este capítulo de libro, el doctorando realizó las experiencias que se muestran en las figuras y participó en la preparación del manuscrito.

Abstract

Zinnia is a rather coarse, easily cultivated annual herb, popular as a cut flower for its warm colors and for its bold, upright appearance. Most zinnias on the market are derived from *Z. elegans*. One of the reasons for zinnia's popularity is the diversity of its forms since, like dahlias and chrysanthemums; they may be single, semi-double, double, cactus, dahlia, and scabious. Zinnias also constitute one of the most useful models for plant biologists, especially for those working in xylem differentiation, a unique process in developmental plant biology, which simultaneously involves secondary cell wall synthesis (which includes lignin biosynthesis) and programmed cell death. In this contribution, and after reviewing zinnia's history, we turn our attention to two zinnia *in vitro* cell culture systems considered useful tools for studying the cell wall lignification process occurring during xylem ontogeny.

<http://www.globalsciencebooks.info/Books/images/FOPBVolume2Outline.pdf>

3. **Autores** (p.o. de firma): **C. Gabaldón**, M. López-Serrano, M.A. Pedreño and A. Ros Barceló

Título: Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis.

Revista: *Plant Physiology*

Clave: **A** Vol: 139 Páginas, inicial: 1138 final: 1154 Fecha: 2005

Lugar de publicación: USA

Contribución del doctorando: En este artículo, el doctorando realizó toda la parte experimental y elaboró las figuras del manuscrito.

Abstract

The major basic peroxidase from *Zinnia elegans* (ZePrx) suspension cell cultures was purified and cloned, and its properties and organ expression were characterized. The ZePrx was composed of two isoforms with a Mr (determined by matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight) of 34,700 (ZePrx34.70) and a Mr of 33,440 (ZePrx33.44). Both isoforms showed absorption maxima at 403 (Soret band), 500, and 640 nm, suggesting that both are high-spin ferric secretory class III peroxidases. Mr differences between them were due to the glycan moieties, and were confirmed from the total similarity of the N-terminal sequences (LSTTFYDTT) and by the 99.9% similarity of the tryptic fragment fingerprints obtained by reverse-phase nano-liquid chromatography. Four full-length cDNAs coding for these peroxidases were cloned. They only differ in the 5'-untranslated region. These differences probably indicate different ways in mRNA transport, stability, and regulation. According to the k_{cat} and apparent K_m values shown by both peroxidases for the three monolignols, sinapyl alcohol was the best substrate, the endwise polymerization of sinapyl alcohol by both ZePrxs yielding highly polymerized lignins with polymerization degrees ≈ 87 . Western blots using anti-ZePrx34.70 IgGs showed that ZePrx33.44 was expressed in tracheary elements, roots, and hypocotyls, while ZePrx34.70 was only expressed in roots and young hypocotyls. None of the ZePrx isoforms was significantly expressed in either leaves or cotyledons. A neighbor-joining tree constructed for the four full-length cDNAs suggests that the four putative paralogous genes encoding the four cDNAs result from duplication of a previously duplicated ancestral gene, as may be deduced from the conserved nature and conserved position of the introns.

<http://www.plantphysiol.org/>

4. **Autores**(p.o. de firma): **Gabaldón,C**; López-Serrano,M; Pomar, F; Merino, F; Cuello, J; Pedreño, M.A y Ros Barceló, A.

Título: Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures.

Revista: *FEBS Letters*

Volumen: 580 Páginas: inicial: 4311 final: 4316 Fecha: 2006

Lugar de publicación: Holanda

Contribución del doctorando: En este artículo, el doctorando realizó toda la parte experimental y elaboró las figuras del manuscrito.

Abstract

The last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures (SCCs) catalyzed by peroxidase (ZePrx) has been characterized. The k_3 values shown by ZePrx for the three monolignols revealed that sinapyl alcohol was the best substrate, and were proportional to their oxido/reduction potentials, signifying that these reactions are driven exclusively by redox thermodynamic forces. Feeding experiments demonstrate that cell wall lignification in SCCs is controlled by the rate of supply of H₂O₂. The results also showed that sites for monolignol b-O-4 cross-coupling in cell walls may be saturated, suggesting that the growth of the lineal lignin macromolecule is not infinite.

<http://www.febsletters.org/>

5. **Autores** (p.o. de firma): **Carlos Gabaldón**, L.V. Gómez Ros, María J. López Núñez-Flores, Alberto Esteban-Carrasco and A. Ros Barceló

Título: Post-translational modifications of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*.

Revista: *Plant Molecular Biology*

Clave: **A** Volumen: 65 Páginas, inicial: 43 final: 61 Fecha: 2007

Lugar de publicación: Alemania

Contribución del doctorando: En este artículo, el doctorando realizó toda la parte experimental y participó en la preparación del manuscrito.

Abstract

The major basic peroxidase (ZePrx) from *Zinnia elegans* suspension cell cultures was purified and cloned. The purification resolved ZePrxs in two isoforms (ZePrx33.44 and ZePrx34.70), whose co-translational and post-translational modifications are characterized. Based on the N-terminal sequence obtained by Edman degradation of mature ZePrxs, it may be expected that the immature polypeptides of ZePrxs contain a signal peptide (N-terminal propeptide) of 30 amino acids, which directs the polypeptide chains to the ER membrane. These immature polypeptides are co-translationally processed by proteolytic cleavage, and modeling studies of digestions suggested that the processing of the N-terminal pro-peptide of ZePrxs is performed by a peptidase from the SB clan (S8 family, subfamily A) of serine-type proteases. When the post-translational modifications of ZePrxs were characterized by trypsin digestion, and tryptic peptides were analyzed by reverse phase nano liquid chromatography (RP-nanoLC) coupled to MALDITOF MS, it was seen that, despite the presence in the primary structure of the protein of several (disulphide bridges, N-glycosylation, phosphorylation and N-myristoylation) potential post-translational modification sites, ZePrxs are only post-translationally modified by the formation of N-terminal pyroglutamate residues, disulphide bridges and N-glycosylation. Glycans of ZePrxs belong to three main types and conduce to the existence of at least ten different molecular isoforms. The first glycans belong to both low and high mannose-type glycans, with the growing structure Man3–9(GlcNAc)2. Low mannose-type glycans, Man3–4(GlcNAc)2, coexist with the truncated (paucimannosidic-type) glycan, Man3Xyl1Fuc1(GlcNAc)2, in the G3 and G4 subisoforms of ZePrx33.44. In ZePrx34.70, on the other hand, the complex-type biantennary glycan, Man3Xyl1Fuc3(GlcNAc)5, and the truncated (paucimannosidic-type) glycan, Man3Xyl1Fuc1(GlcNAc)2, appear to fill the two putative sites for N-glycosylation. Since the two N-glycosylation sites in ZePrxs are located in an immediately upstream loop region of helix F $\phi\phi$ (close to the proximal histidine) and in helix F $\phi\phi$ itself, and are flanked by positive-charged amino acids that produce an unusual positive-net surface electrostatic charge pattern, it may be expected that glycans not only affect reaction dynamics but may well participate in protein/cell wall interactions. These results emphasize the complexity of the ZePrx proteome and the difficulties involved in establishing any fine structure-function relationship.

<http://link.springer.com/journal/11103>

6. **Autores** (p.o. de firma): L.V. Gómez Ros, **Carlos Gabaldón**, Federico Pomar, Fuencisla Merino, María A. Pedreño and A. Ros Barceló

Título: Structural motifs of syringyl peroxidases predate not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes.

Revista: *New Phytologist*

Clave: **A** Volumen: 173 Páginas, inicial: 63 final: 78 Fecha: 2007

Lugar de publicación: Inglaterra

Contribución del doctorando: En este artículo, el doctorando realizó parte de la experimental, elaboró las figuras y participó en la preparación del manuscrito.

Abstract

Nitric oxide (NO) is currently regarded as a signal molecule involved in plant cell differentiation and programmed cell death.

- Here, we investigated NO production in the differentiating xylem of *Zinnia elegans* by confocal laser scanning microscopy to answer the question of whether NO is produced during xylem differentiation.
- Results showed that NO production was mainly located in both phloem and xylem regardless of the cell differentiation status. However, there was evidence for a spatial NO gradient inversely related to the degree of xylem differentiation and a protoplasmic NO burst was associated with the single cell layer of pro-differentiating thin-walled xylem cells. Confirmation of these results was obtained using *trans*-differentiating *Z. elegans* mesophyll cells. In this system, the scavenging of NO by means of 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) inhibits tracheary element differentiation but increases cell viability.
- These results suggest that plant cells, which are just predetermined to irreversibly *trans*-differentiate in xylem elements, show a burst in NO production, this burst being sustained as long as secondary cell wall synthesis and cell autolysis are in progress.

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1469-8137](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1469-8137)

Capítulo 2: Regulación de la peroxidasa fuertemente básica de *Zinnia elegans* por el óxido nítrico en el proceso de lignificación

1. Nitric Oxide, Peroxidase and Lignification in Higher Plants. *Nitric Oxide Signaling in Higher Plants*. 2004
2. Nitric Oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytologist*. 2005

Para realizar esta parte del trabajo de Investigación hemos escogido una planta que se ha utilizado como modelo en estudios de diferenciación del xilema: *Zinnia elegans* que pertenece a una de las familias más evolucionadas dentro de las angiospermas, las asteráceas. De hecho, en los estudios previos también hemos utilizado este sistema modelo, principalmente debido a la dualidad y simplicidad del patrón de lignificación encontrado en tallos e hipocótilos de *Zinnia* (Ros Barceló y cols., 2000a) y por el patrón de isoenzimas de peroxidasa que presentan, restringido casi por completo a la presencia de una única isoenzima de naturaleza fuertemente básica (López-Serrano y cols., 2004).

Esta diferenciación del xilema que se activa en las células cambiales durante el desarrollo vascular, también puede ponerse de manifiesto en células que normalmente no se diferencian en elementos traqueales, como las células del mesófilo foliar en respuesta a factores medioambientales diversos a través de programas metabólicos y de desarrollo controlados temporalmente. Así, los genes específicos del xilema, que se silencian a nivel de la transcripción en ciertos tipos de células como las del mesófilo, se pueden activar, en respuesta a diferentes factores, haciendo de este sistema un modelo valioso y especial para el estudio de la naturaleza y el desarrollo temporal del xilema.

La diferenciación de los elementos traqueales en sistemas celulares, especialmente los que derivan de las células del mesófilo de *Zinnia elegans* también representan un sistema modelo único para estudiar la deposición de la pared celular secundaria, la biosíntesis de ligninas y la muerte celular programada, por lo que las interrelaciones entre estos procesos celulares especiales serán investigadas. Esto es debido al hecho de que el proceso de diferenciación de las células del mesófilo a elementos traqueales se produce de manera sincrónica en un gran número de células, a partir de una población celular relativamente homogénea, haciendo posible el estudio de la bioquímica y fisiología de la xilogénesis de una manera independiente de la complejidad que supondría su estudio en el tejido vegetal.

La muerte celular programada es una de las características más distintivas del xilema en diferenciación y se trata de un proceso estrechamente coordinado con los procesos de formación de la pared celular secundaria y lignificación. La muerte celular de los elementos xilemáticos conlleva una

liberación de calcio en la célula vegetal acompañada de un rápido colapso de la vacuola por el que se liberan enzimas hidrolíticas y el cese de la corriente citoplásmica y la muerte celular. La coordinación entre la síntesis de la pared celular y la muerte celular requiere la segregación de proteasas específicas y, aunque parte de la cascada metabólica que conduce a la muerte celular en el xilema es conocida, poco se sabe acerca de las señales celulares que disparan este inevitable proceso.

Una de estas posibles señales es el óxido nítrico (NO) ya que ha sido descrito como una molécula señal implicada en la diferenciación celular y en la muerte celular que caracteriza la respuesta hipersensible desencadenada a través de una cooperación, estrechamente equilibrada con las especies reactivas del oxígeno, O_2^- y H_2O_2 por lo que no sería descartable que estas tres moléculas trabajasen juntas durante la muerte celular programada que caracteriza la diferenciación del xilema. Sin embargo, hasta la fecha en la que se realizaron los estudios de la presente Memoria, no había datos disponibles que nos confirmasen que las células del xilema fuesen capaces de producir NO y, por lo tanto, la naturaleza y la extensión de la producción de NO por dichas células no había sido investigada.

El NO es una molécula radical, relativamente estable, implicada en multitud de procesos fisiológicos en plantas donde actúa como mensajero químico en procesos de citotoxicidad y muerte celular programada. En células animales, la mayor parte de sus propiedades reguladoras se han explicado en base a su capacidad para actuar como un ligando del hierro en las hemoproteínas, por lo que su efecto activador o inhibidor sobre estas proteínas y la naturaleza de este efecto depende, en gran parte, del estado de oxidación de la hemoproteína que condiciona las propiedades del ligando y la configuración electrónica del hierro hemínico. Sin embargo, el efecto del NO no se restringe a las hemoproteínas ya que, por sus propiedades químicas, podría actuar sobre otras metaloproteínas que contienen cobre o zinc e incluso sobre aquellas que contienen grupos tioles. En este sentido, el NO podría ejercer un efecto directo sobre las enzimas de la ruta biosintética de ligninas interaccionando con las metaloproteínas (C4H, C3H, CAld5H y peroxidasa). Este hecho es especialmente relevante ya que el NO podría ser entonces una señal clave en las etapas últimas características de la biosíntesis de ligninas.

El nitroprusiato sódico (NPS) es un compuesto que, a concentraciones comprendidas entre 1 y 5 mM, es capaz de liberar y mantener en disolución acuosa concentraciones micromoleculares de NO, al menos durante los primeros minutos de su descomposición. Sin embargo, la química del NO es bastante compleja ya que, en disoluciones acuosas aireadas, NO reacciona rápidamente con O₂ molecular para producir NO₂ y éste a su vez puede volver a reaccionar con NO para formar N₂O₃. Por este motivo, las disoluciones de NPS contienen una mezcla compleja de óxidos nítricos en la que NO puede constituir la especie química mayoritaria (a tiempos cortos) o estar presente en cantidades minoritarias (a tiempos largos).

La actividad biológica de los óxidos de nitrógeno puede analizarse en presencia de PTIO (2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oxil-3-óxido) ya que este compuesto reacciona específicamente con NO para dar NO₂ y, por lo tanto, cualquier efecto observable como consecuencia de la adición de NPS que sea reversible por PTIO puede asignarse a un efecto del NO mientras que los efectos biológicos del NPS que no sean reversibles por PTIO deberán asignarse a otros óxidos de nitrógeno, tales como NO₂ y N₂O₃.

Con estos antecedentes, las primeras experiencias que se realizaron se centraban en el análisis del efecto que podía tener la liberación de NO sobre la actividad peroxidasa del xilema en diferenciación de *Z. elegans in vitro* e *in planta*. Los resultados que obtuvimos mostraron que la adición del NPS inhibía más del 50% de la actividad peroxidasa obtenida del fluido intercelular del tallo de *Z. elegans* utilizando tetrametilbencidina (TMB) como sustrato. Esta inhibición se revirtió mediante la adición de PTIO, lo que prueba que el efecto observado se debía al NO. Estos ensayos se complementaron con estudios electroforéticos en los que las isoenzimas de peroxidasa se resolvieron por IEF y electroforesis catiónica. Estos resultados revelaron que la disminución brusca de la expresión de las isoformas de peroxidasa se debía a la liberación del NO ya que este efecto fue revertido por la adición de PTIO. De manera similar se procedió a estudiar el efecto de esta molécula liberadora de NO sobre la actividad TMB oxidasa en el xilema en lignificación de *Z. elegans*. Como sucedió en los ensayos realizados *in vitro*, la actividad TMB oxidasa también se inhibió por la adición de NPS y la reversión se produjo con la adición de PTIO.

Todos estos resultados obtenidos en ensayos bioquímicos e histoquímicos sugerían un papel clave para el NO en el control de la diferenciación del tejido vascular de *Z. elegans*, incluyendo probablemente el proceso de lignificación de la pared celular. Sin embargo, la aplicación de NO a tejidos vegetales y el análisis posterior de la respuesta observada no resultaba una prueba fehaciente de que el NO se produjese en ese tejido y si ocurría, fuese además una molécula reguladora de este proceso fisiológico.

OBJETIVOS

Con estos antecedentes, se planteó la hipótesis de que si localizáramos la producción del NO en el xilema en diferenciación, todos los posibles cruces expuestos entre el NO y las rutas metabólicas que se expresan diferencialmente en el tejido vascular, incluyendo la muerte celular, no podrían considerarse fortuitos. Si se demuestra la capacidad del xilema en diferenciación para producir NO y se identifican los lugares de actuación del NO se podría elucidar la función real que juega el NO en la xilogénesis y en la lignificación de la pared celular. Para la demostración de esta última aseveración también era preciso averiguar la localización precisa de los lugares de producción de H₂O₂ y si existía alguna correlación espacio-temporal entre la manifestación de estas señales y el proceso de lignificación de la pared celular (en Anexo). Para ello, habría que demostrar el efecto que el NO ejercería sobre las enzimas catalizadoras del acoplamiento oxidativo de los monolignoles en la pared celular.

Por lo tanto el objetivo principal de este capítulo fue estudiar la producción de NO en el xilema en diferenciación de *Z. elegans*. Estos estudios se extendieron a su localización en un cultivo de células de mesófilo de *Z. elegans* que se diferencian a elementos traqueales. De manera similar se procedió a realizar un estudio detallado de los lugares de producción del H₂O₂ (en Anexo). Habiendo realizado la purificación a homogeneidad de la peroxidasa de naturaleza fuertemente básica en el capítulo anterior, se intentó comprobar si el NO ejercía un efecto directo sobre esta proteína con la finalidad de encontrar resultados que apoyasen la regulación de estas peroxidasas básicas por NO en el proceso de lignificación.

Las conclusiones más relevantes de este Capítulo se describen a continuación:

Producción de óxido nítrico y H₂O₂ en los haces vasculares

Los elementos conductores son los responsables del mantenimiento de la producción de NO. Estos resultados se obtuvieron utilizando un indicador fluorescente que permite la visualización en tiempo real del NO *in situ* y la microscopía confocal láser de barrido. La tinción fluorescente se localizó principalmente, en las paredes celulares del xilema así como en las fibras del floema, con independencia del estado de diferenciación celular. Sin embargo, se observó un gradiente espacial de producción de NO inversamente relacionado con el grado de diferenciación del xilema ya que las células del xilema jóvenes, en diferenciación manifestaron una mayor capacidad para producir NO que las células del xilema completamente maduras y diferenciadas. Estos resultados demuestran la fuerte relación entre la producción de NO y la muerte celular programada que se produce durante la diferenciación del xilema y que precede a la lignificación de la pared celular.

En las células predeterminadas del xilema aún vivas, la producción de NO se localizó en el protoplasto y en las paredes celulares, sugiriendo la existencia de, al menos, dos posibles lugares de producción de NO, siendo probablemente, estas células cambiales, pre-determinadas para diferenciarse irreversiblemente a elementos del xilema, las que generan y mantienen la producción de NO mientras que la síntesis de la pared celular secundaria y la autólisis celular se producen. Adicionalmente, se realizó un estudio detallado de los sitios de producción de H₂O₂ en el xilema en lignificación mediante la utilización conjunta de técnicas de microscopía óptica y electrónica (en Anexo). De esta manera, se comprobó que en las células del xilema en diferenciación y en las células del parénquima adyacentes se localizaba la producción de H₂O₂ sugiriendo que estas células parenquimáticas podrían ser las responsables de la producción de H₂O₂ que, posteriormente, difunde de célula a célula, a través del espacio intercelular hacia las células del xilema en diferenciación para que tenga lugar la biosíntesis de ligninas en la pared celular secundaria.

Producción de óxido nítrico y H₂O₂ en los elementos traqueales

La producción de NO en las células del mesófilo de *Z. elegans* que se diferencian a traqueidas mantienen la misma propiedad mostrada por las células del xilema en diferenciación ya que la señal fluorescente se detectó, principalmente, en las células predeterminadas y en las que se encontraban en diferenciación. Por el contrario, las células aisladas del mesófilo que no habían adquirido la capacidad para diferenciarse a traqueidas, manifestaban unos niveles muy débiles de la señal fluorescente que contrastaba con la producción elevada mostrada por las células predeterminadas para diferenciarse a traqueidas.

Una evidencia adicional que apoyó la hipótesis planteada se obtuvo mediante la localización del H₂O₂ en los cultivos celulares de mesófilo de *Z. elegans* en diferenciación a elementos traqueales (en Anexo). Utilizando este sistema modelo junto con la microscopía confocal láser y el diacetato de diclorofluoresceína como sonda fluorescente, la producción de H₂O₂ se localizó mayoritariamente en las células del mesófilo predeterminadas para diferenciarse, detectándose un bajo nivel de H₂O₂ en los elementos traqueales completamente diferenciados. Además, los niveles de H₂O₂ detectados en el cultivo celular fueron del orden de mM y acordes con los estimados *in situ* en el xilema en lignificación de *Z. elegans* cuando se utilizó IK/almidón para la detección del H₂O₂.

Estos resultados sugieren que el NO producido por las células en diferenciación se sintetiza en el momento preciso en el que éstas adquieren la capacidad para la muerte celular. Estos resultados también explican el porqué las células predeterminadas, localizadas en los haces vasculares del xilema también mostraban un estallido de NO que, como ocurría en los sistemas celulares, se mantiene mientras que se produce la ruptura celular confirmando que la formación de NO esta directamente relacionada con los procesos tempranos de la diferenciación del xilema que se producen inmediatamente antes de que se manifieste la autólisis celular y los procesos de formación de la pared celular secundaria.

Efecto de NO sobre la peroxidasa fuertemente básica de *Zinnia elegans*

Los estudios de resonancia paramagnética electrónica y óptica sugieren que se forman complejos en las dos peroxidases purificadas mediante la unión de NO a la protoporfirina IX. Estos complejos diferían en su espectro de absorción en el que la banda Soret a 405 nm se desplazaba a 419 nm y las bandas de absorción α y β correspondientes a las λ de 495 y 636 nm se desplazaban hacia las λ de 533 y 568 nm, respectivamente. Las curvas y las posiciones de estas bandas eran las características de peroxidases ferrosas de bajo espín confirmando así la unión de esta molécula radical al grupo prostético de la proteína, formándose un complejo con NO, característico de peroxidases de Fe^{2+} de bajo espín.

Capítulo 2: Regulación de la peroxidasa fuertemente básica de *Zinnia elegans* por el óxido nítrico en el proceso de lignificación

Índice de artículos:

7. **Autores** (p.o. de firma): A. Ros Barceló, **C. Gabaldón** and F. Pomar

Título: Nitric oxide, peroxidase and lignification in higher plants

Libro: *NO Signaling in higher plants* (Eds. J.R. Magalhaes, R.P. Singh and L.P. Passos)

Clave: **R** Páginas, inicial: 277 final: 308 Fecha: 2004

Editorial (si libro): Studium Press

Lugar de publicación: USA

Contribución del doctorando: En esta revisión el doctorando realizó la búsqueda bibliográfica, participó en la realización de las figuras y en la preparación del manuscrito.

Abstract

Lignins are complex cell wall phenolic heteropolymers which result from the peroxidase-mediated oxidative polymerization of three p-hydroxycinnamyl alcohol, p-cumaryl, coniferyl and sinapyl alcohol, giving rise within the lignin polymer to H (p-hydroxyphenyl), G (guaiacyl), and S (syringyl) units, respectively. Lignins are mainly localized in the impermeable water transport conduits of the xylem and phloem fibers, vascular tissues which are also capable for sustaining NO production. In fact, when NO production was estimated in both vascular bundles and tracheary elements from *Zinnia elegans* by confocal laser scanning microscopy, using 4, 5 -diaminofluorescein diacetate as fluorescent probe, NO was mainly located in primary and secondary xylem cell walls, as well as in phloem fibers, regardless of the cell differentiation status. However, there was evidence for an NO gradient related to the degree of xylem differentiation, so that the capability for NO production and cell wall lignification are apparently two inversely related metabolic processes. These results are not surprising since all the branching (also rate limiting) enzymes of the lignin biosynthetic pathway (cinnamate-4-hydroxylase, p-coumarate-3-hydroxylase and coniferylaldehyde-5-hydroxylase) and the lignin-assembling enzyme (peroxidase) are heme proteins and, therefore, possible targets of NO action. This is especially important since any possible metabolic control of NO on these enzymes would enable it to regulate not only the global p-hydroxycinnamyl alcohol pools in lignifying plant cells and the H/G/S ratio for carbon partitioning, but also their rates of polymerization. In the case of peroxidase, there is also evidence for a lot of additional cross-talks with NO, so that these cross-talks should be considered far from being fortuitous. In fact, NO may be regarded as a peroxidase substrate, and so peroxidase could play any role in NO (and ONOO⁻) detoxification in lignifying plant tissues. That this situation is rather complex is illustrated, finally, by the participation of peroxidase in biomimetic NO-synthesizing pathways, which are similar to that catalyzed by the NO-forming enzyme, NO synthase.

url: ¿?

8. **Autores** (p.o. de firma): **C. Gabaldón**, Laura V. Gómez Ros, María A. Pedreño and A. Ros Barceló

Título: Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*

Revista: *New Phytologist*

Clave: **A** Volumen: 165 Páginas, inicial: 121 final: 130 Fecha: 2005

Lugar de publicación: Inglaterra

Contribución del doctorando: En este artículo, el doctorando realizó toda la parte experimental y elaboró las figuras del manuscrito.

Abstract

- The most distinctive variation in the monomer composition of lignins in vascular land plants is that found between the two main groups of seed plants. Thus, while gymnosperm lignins are typically composed of guaiacyl (G) units, angiosperm lignins are largely composed of similar levels of G and syringyl (S) units.
- However, and contrary to what might be expected, peroxidases isolated from basal (Cycadales and Ginkgoales) and differentially evolved (Coniferales and Gnetales) gymnosperms are also able to oxidize S moieties, and this ability is independent of the presence or absence of S-type units in their lignins.
- The results obtained led us to look at the protein database to search for homologies between gymnosperm peroxidases and true eudicot S-peroxidases, such as the *Zinnia elegans* peroxidase.
- The findings showed that certain structural motifs characteristic of eudicot S-peroxidases (certain amino acid sequences and β -sheet secondary structures) predate the gymnosperm–angiosperm divergence and the radiation of tracheophytes, since they are found not only in peroxidases from basal gymnosperms, ferns and lycopods, but also in peroxidases from the moss *Physcomitrella patens* (Bryopsida) and the liverwort *Marchantia polymorpha* (Marchantiopsida), which, as typical of bryophytes, do not have xylem tissue nor lignins.

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1469-8137](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1469-8137)

Anexo:

9. **Autores** (p.o. de firma): L.V. Gómez-Ros, A. Paradiso, **C. Gabaldón**, M.A. Pedreño, L. de Gara and A. Ros Barceló

Título: Two distinct cell sources of H₂O₂ in the lignifying *Zinnia elegans* cell culture system

Revista: *Protoplasma*

Clave: A **Vol:** 227 **Páginas,** inicial: 175 final: 183 **Fecha:** 2006

Lugar de publicación: Austria

Contribución del doctorando: En este artículo, el doctorando realizó una parte de la experimental, búsqueda bibliográfica, participó en la realización de las figuras y en la preparación del manuscrito.

Summary.

The use of transdifferentiating *Zinnia elegans* mesophyll cells has proved useful in investigations of the process of xylem differentiation from cambial derivatives. Cultured mesophyll cells can be induced by external stimuli to proceed through temporally controlled developmental programs which conclude in the formation of single-cell-derived dead vascular tracheids and parenchyma-like elements. However, there is a gap in our knowledge concerning the role played by reactive oxygen species (O₂ and H₂O₂) in the development of these vascular elements. In this study, we show by the following four independent and highly selective methods that transdifferentiating *Z. elegans* mesophyll cells are capable of producing reactive oxygen species: the 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay, which monitors O₂ production, and the xylenol orange, 2,7-dichlorofluorescein diacetate, and CeCl₃ assays, which monitor H₂O₂ production and localization. The joint use of these biochemical (XTT and xylenol orange) assays and cytochemical (2,7-dichlorofluorescein diacetate and CeCl₃) probes revealed that transdifferentiating *Z. elegans* mesophyll cells do not show an oxidative burst but live in a strongly oxidative state during the entire culture period. In this state, H₂O₂ is produced by both tracheary and parenchyma-like elements, the nonlignifying parenchyma-like cells acting quantitatively as the main source. The existence of these two sources of H₂O₂ in this in vitro cell culture system may be especially relevant during the later stages of tracheary cell wall lignification, in which lignifying tracheary elements become hollow. In the case of differentiating tracheary elements, H₂O₂ was located in the same place and at the same time as the onset of tracheary element lignification, i.e., at the primary cell wall during secondary thickening, supporting the view that the H₂O₂ produced by this in vitro culture system is destined for use during lignin biosynthesis.

<http://link.springer.com/journal/709>

10. **Autores** (p.o. de firma): L.V. Gómez-Ros, **C. Gabaldón**, M. J. López Núñez-Flores, J. Gutiérrez, J. Herrero, J. M. Zapata, M. Sottomayor, J. Cuello, A. Ros Barceló

Título: The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains cis-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide.

Revista: *Planta*

Clave: **A** Volume: 236 Páginas, inicial: 327 final: 342 Fecha: 2012

Lugar de publicación: Alemania

Contribución del doctorando: En este artículo, el doctorando realizó una parte de la experimental y participó en la realización de las figuras.

Abstract

NO and H₂O₂ are important biological messengers in plants. They are formed during xylem differentiation in *Zinnia elegans* and apparently play important roles during the xylogenesis. To ascertain the responsiveness of the *Z. elegans* peroxidase (ZePrx) to these endogenous signals, the effects of NO and H₂O₂ on ZePrx were studied. The results showed that ZePrx is up-regulated by NO and H₂O₂, as confirmed by RT-qPCR, and that its promoter contains multiple copies of all the putative cis-elements (ACGT box, OCS box, OPAQ box, L1BX, MYCL box and W box) known to confer regulation by NO and H₂O₂. Like other OCS elements, the OCS element of ZePrx contains the sequence TACG that is recognized by OBF5, a highly conserved bZIP transcription factor, and the 10 bp sequence, ACAaTTTTGG, which is recognized by OBP1, a Dof domain protein that binds down-stream the OCS element. Furthermore, the ZePrx OCS element is flanked by two CCAAT-like boxes, and encloses one auxin-responsive ARFAT element and two GA3-responsive Pyr boxes. Results also showed that ZePrx may be described as the first protein to be up-regulated by NO and H₂O₂, whose mRNA contains several short-longevity conferring elements, such as a downstream (DST) sequence analogous to the DSTs contained in the highly unstable SAUR transcripts. The presence of these regulatory elements strongly suggests that ZePrx is finely regulated, as one may expect from an enzyme that catalyzes the last irreversible step of the formation of lignins, the major irreversible sink for the photosynthetically fixed CO₂.

<http://link.springer.com/journal/425>

- Allen GJ, Muir SR, Sanders D. 1995. Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* 268: 735–737.
- 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.
- Alston, T. A., Porter, D. J. T. and Bright, H. J. (1985). Generation of nitric oxide by enzymatic oxidation of N-hydroxy-N-nitrosamines. *J. Biol. Chem.*, 260: 4069-4074.
- 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.
- Anterola, A.M., van Rensburg, H., van Heerden, P.S., Davin, L.B., Lewis, N.G., 1999. Multi-site modulation of flux during monolignol formation in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261, 652–657.
- 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.
- Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. and Murad, F. 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increase guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3203-3207.
- Ascenzi, P., Brunori, M., Coletta, M. and Desideri, A. (1989). pH effects on the haem iron co-ordination state in the nitric oxide and deoxy derivatives of ferrous horseradish peroxidase and cytochrome c peroxidase. *Biochem. J.*, 258: 473-478.
- Baier M, Goldberg R, Catesson AM, Francesch C y Rolando C. 1993. Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochemistry* 32: 789-793.
- 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.
- Barceló, A. R., & Aznar-Asensio, G. J. (2002). Basic peroxidases in cell walls of plants belonging to the Asteraceae family. *Journal of plant physiology*, 159(4), 339-345.
- Barceló, A. R., Pomar, F., Ferrer, M. A., Martínez, P., Ballesta, M. C., & Pedreño, M. A. (2002). In situ characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiologia Plantarum*, 114(1), 33-40.
- Barceló, A. R., Ros, L. V. G., & Carrasco, A. E. (2007). Looking for syringyl peroxidases. *Trends in plant science*, 12(11), 486-491.
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupiañez JA, del Rio LA. 1999. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry* 274: 36729–36733.

- Beligni, M. V. and Lamatina, L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210: 215-221.
- Beligni, M. V. and Lamattina, L. 1999a. Is nitric oxide toxic or protective? *Trends Plant Sci.*, 4: 299-300.
- Beligni, M. V. and Lamattina, L. 1999b. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta*, 208: 337-344.
- Beligni, M. V. and Lamattina, L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ.*, 24: 267-278.
- Beligni, M. V. and Lamattina, L. 2002. Nitric oxide interferes with plant photooxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.*, 25: 737-748.
- Bell-Lelong, D. A., Cusumano, J. C., Meyer, K., & Chapple, C. (1997). Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis* (regulation in response to development and the environment). *Plant Physiology*, 113(3), 729-738.
- Berthet S, Thevenin T, Baratiny D, Demont-Caulet N, Debeaujon I, Bidzinski P, Lepié JC, Huis R, Hawkins S, Gomez LD, Lapierre C yJouanin L. 2012. Role of laccases in ligni polymerization. In: LapierreC, Joanin L, eds. *Advances in botanical research. Lignins: biosynthesis, biodegradation and bioengineering*. London: Elsevier, 145-172.
- Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., Bidzinski, P., Cézard, L., Le Bris, P., ... & Jouanin, L. (2011). Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *The Plant Cell*, 23(3), 1124-1137.
- Bethke, P. C., & Jones, R. L. (2001). Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *The Plant Journal*, 25(1), 19-29.
- Bethke, P. C., Badger, M. R. and Jones, R. L. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16: 332-341.
- 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.
- Bodgan, C. 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.*, 11: 66-75.
- 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.
- Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delaforge M, Henry Y, Mansuy D. 1992a. Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of Nw-hydroxy-Larginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 187: 880–886.
- Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delaforge M, Mansuy D. 1992b. Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of Nw-hydroxy-L-arginine by

- hemeproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184: 1158–1164.
- Boveris AD, Galatro A, Puntarulo S. 2000. Effect of nitric oxide and plant antioxidants on microsomal content of lipid radicals. *Biological Research* 33: 159–165.
- 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, Setälä 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, Gruissem 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, T., Xian, M. and Wang, P. G. (2002). Electrochemical and peroxidase oxidation study of N'-hydroxyguanidine derivatives as NO donors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 1507-1510
- Caliskan M y Cuming AC. 1998. Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination. *Plant J* 15: 165–171.
- Carimi F, Zottini M, Formentin E, Terzi M, Lo Schiavo F. 2002. Cytokinins, new apoptotic inducers in plants. *Planta* 216: 413–421.
- Caro A, Puntarulo S. 1998. Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. *Physiologia Plantarum* 104: 357–364.
- 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. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476.
- Cassab GI y Varner JE. 1988. Cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol* 39: 321-353.
- 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.
- Chandok, M. R., Ytterberg, A. J., van Wijk, K. J. and Klessig, D. F. 2003. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell*, 113: 469-482.
- 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-

- especific 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.
- Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ. 2000. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in Arabidopsis thaliana suspension cultures. *Plant Journal* 24: 667-677.
- Converso DA y Fernández ME. 1996. Ca²⁺ activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control. *Arch Biochem Biophys* 333: 259-65.
- Cooney RV, Harwood PJ, Custer LJ, Franke AA. 1994. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives* 102: 460-462.
- Corpas FJ, Barroso JB, Esteban FJ, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Carreras A, Quirós M, León AM, Palma JM, Sandalio LM, del Río LA. 2001. Peroxisomes as a source of nitric oxide in plant cells. *Free Radical Biology and Medicine* 33: S73.
- 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.
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M. L., Rodrigo, J., Lamas, L. and Golvano, M. P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters*, 398: 159-164.
- 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.
- de Pinto MC, Tomassi F, de Gara L. 2002. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiology* 130: 698-708.
- De Pinto, M. C., Tommasi, F. and De Gara, L. (2002). Ascorbate and ascorbate peroxidase in programmed cell death. In: *Plant Peroxidases* (Eds. Acosta, M., Rodríguez-López, J. and Pedreño, M. A.) University of Murcia, Murcia pp 237-244.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 13454-13459.

- 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.
- Demura, T., Tashiro, G., Horiguchi, G., Kishimoto, N., Kubo, M., Matsuoka, N., Minami, A., Nagata-Hiwatashi, M., Nakamura, K., Okamura, Y., Sassa, N., Suzuki, S., Yazaki, J., Kikuchi, S. and Fukuda, H. (2002) Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15794-15799.
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S. 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 16314–16318.
- 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.
- Draper, J. 1997. Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends in Plant Science*, 2: 163-165.
- 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.
- Durner J, Klessig DF. 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 369–374.
- Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D. F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 10328-10333.
- 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.
- Ferrer MA, Barcelo AR. 1999. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant, Cell & Environment* 22: 891–897.
- 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.
- Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P. and Wever, R. (1993). Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur. J. Biochem.*, 215: 767-775.
- 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.
- 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.
- Fukuto, J. M. and Ignarro, L. J. (1997). In Vivo aspects of nitric oxide (NO) chemistry: does peroxynitrite (ONOO^-) play a major role in cytotoxicity?. Accounts Chem. Res., 30: 149-152.
- Furchgott RF. 1995. Special topic: nitric oxide. Annual Review of Physiology 57: 659-682.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, 288: 373-376.
- García-Mata C, Lamattina L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. Plant Physiology 126: 1196-1204.
- García-Mata C, Lamattina L. 2002. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. Plant Physiology 128: 790-792.
- Gebicka, L. and Gebicki, J. L. (2000). Reactions of heme peroxidases with peroxynitrite. IUBMB Life, 49: 11-15.
- Godber BLJ, Doel JJ, Durgan J, Eisenthal R, Harrison R. 2000a. A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. FEBS Letters 475: 93-96.
- Godber BLJ, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R. 2000b. Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase. Journal of Biological Chemistry 275: 7757-7763.
- Gómez-Ros LV, Gabaldón C, López Núñez-Flores MJ, Gutiérrez J, Herrero J, Zapata JM, Sotomayor 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.
- Grabber, J. H., Ralph, J. and Hatfield, R. D. 1998 Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferylaldehyde. J. Sci. Food Agric. 78, 81-87.
- Grace, S. C., Salgo, M. G. and Prior, W. A. (1998). Scavenging of peroxynitrite by a phenolic/peroxidase system prevents oxidative damage to DNA. FEBS Lett., 426: 24-28.

- 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
- Grubusic, D. and Konjevic, R. (1990). Light and nitrate interaction in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tormentosa* seeds. *Planta*, 181: 239-243.
- Grubusic, D., Giba, Z. and Konjevic, R. (1992). The effect of organic nitrates in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tormentosa* seeds. *Photobiol.*, 56: 629-632.
- Guo, F-Q., Okamoto, M. and Crawford, N. M. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science*, 302: 100-103.
- 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.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1984. oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. *Biochem. J.*, 219: 1-14.
- Hancock JT, Salisbury V, Ovejero-Boglione MC, Cherry R, Hoare C, Eisenthal R, Harrison R. 2002. Antimicrobial properties of milk: dependence on the presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 3308–3310.
- Hancock JT. 1997. Cell signalling. Harlow, UK: Longman.
- Harholt J, Suttangkakul A and Scheller HV. 2010. Biosynthesis of pectins. *Plant Physiol.* 153: 384–39.
- Harper, J. E. 1981. Evolution of nitrogen oxide(s) during in vivo nitrate reductase assay of soybean leaves. *Plant Physiol.*, 68: 1488-1493.
- Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radical Biology Medicine* 33: 774–797.
- 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.
- Herrmann, K. M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell*, 7: 907-919.
- Hibbs, J. B. and Bastian, N. R. (1999). The discovery of the biological synthesis of nitric oxide. See Ref. Fang, F. C. (1999). Nitric oxide and infection. New York: Kluwer/Plenum: 13-33.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24: 23-63.
- 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.
- Hogg, N., Kalyanaraman, B., Joseph, J., Struck, A. and Parthasarathy, S. 1993. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett.*, 334: 170-174.
- Holm KB, Andreasen 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.

- Horemans, N., Foyer, C. H. and Asard, H. 2000. Transport and action of ascorbate at the plasma membrane. *Trends Plant Sci.*, 5: 263-267.
- Huang J, Sommers EM, Kim-Shapiro DB, King SB. 2002. Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *Journal of the American Chemical Society* 124: 3473–3480.
- Huie, R. E., Padmaja, S. 1993. The reaction of NO with O₂⁻. *Free Radical Res. Com.*, 18: 195-199.
- Hung, K. T., Chang, C. J. and Kao, C. H. (2002). Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *J. Plant Physiol.*, 159: 159-166.
- Ichimura, K., Tena, G. et al. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants : a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7: 301-308.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. and Word, K. S. (1987). Endothelium-Ischiropoulos, H., Nelson, J., Duran, D. and Al-Mehdi, A. (1996). Reactions of nitric oxide and peroxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: interference with the determination of hydrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.*, 20: 373-381.
- Jeffrey, S. R. and Snyder, S. H. (1995). Nitric oxide: a neural messenger. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11: 417-440.
- 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.
- Jiang M, Zhang J. 2002. Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* 215: 1022–1030.
- 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.
- 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 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.

- Klepper LA. 1979. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmosphere and Environment* 13: 537.
- 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.
- 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, 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.
- Lamattina L, Beligni MV, Garcia-Mata C, Laxalt AM. 2001. Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds. US Patent. US 6242384 B1.
- 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.
- Leckie, C. P., McAinsh, M. R. and Hetherington, A. M. 1998. cADPR and stomatal closure. *Plant Physiol.*, 114 (Suppl.): 272.
- Leckie, C. P., McAinsh, M. R., Allen, G. J., Sanders, D. and Hetherington, A. M. 1998. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 155837-115842.
- Lee KJ, Marcus SE y Knox JP. 2011. Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. *Mol. Plant*. 4: 212-219.
- Leshem, Y. Y., Wills, R. B. H. and Ku, V. V. V. 1998. Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous regulating factor in higher plants. *Plan Physiol. Biochem*, 36: 825-833.
- Lewis NG y Yamamoto E. 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496.
- 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, J., Kinoshita, J., Pandey, S., Ng, C. K. Y., Gygi, S. P., Shimazaki, K. and Assmann, S. M. 2002. Modulation of an RNA-binding protein by abscisic acid-activated protein kinase. *Nature* 418: 793-797.
- Lipton, S. A., Choi, Y-B., Pan, Z-H., Lei, S. Z., Chen, H-SV., et al. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature*, 364: 626-632.

- Liszkay 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.
- Liu CJ. 2012. Deciphering the enigma of lignification: Precursor transport, oxidation and the topochemistry of lignin assembly. *Mol Plant.* 1-14
- Liu, L., Dean, J. F., Friedman, W. E., & Eriksson, K. E. L. (1994). A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *The Plant Journal*, 6(2), 213-224.
- Lloyd-Jones, D. M. and Bloch, K. D. (1996). The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu. Rev. Med.*, 47: 365-375.
- 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.
- Lopez-Molina, D., Heering, H. A., Smulevich, G., Tudela, J., Thorneley, R., García-Canovas, F. and Rodríguez-Lopez, J. N. 2003. Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94: 243–254.
- 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.
- Mansuy D, Boucher J-L. 2002. Oxidation of N-hydroxyguanidines by cytochromes P450 and NO-synthases and formation of nitric oxide. *Drug Metabolism Review* 34: 593–606.
- Marjamaa K, Kukkola EM y Fagerstedt KV. 2009. The role of class III peroxidases in lignification. *J Exp Bot.* 60: 367-376.
- Martin, C. T., Morse, R. H., Kanne, R. M., Gray, H. B., Malmstrom, B. G. and Chan, S. I. (1981). Reaction of nitric oxide with tree and fungal laccase. *Biochemistry*, 20: 5147-5155.
- Martinez, A. T., & Speranza, M. (2005). Ruiz-Due nas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol*, 8, 195-204.
- 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.
- 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.
- Michon, T., Chenu, M., Kellershon, N., Desmadril, M. and Guéguen, J. (1997). Horseradish peroxidase oxidation of tyrosine-containing peptides and their subsequent polymerization: a kinetic study. *Biochemistry*, 36: 8505-8513.

- Milioni, D., Sado, P., Stacey, N. J., Roberts, K. and McCann, M. C. (2002). Early gene expression associated with the commitment and differentiation of a plant tracheary element is revealed by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis. *The Plant Cell*, 14: 2813-2824.
- Millar, A. H. and Day, D. A. 1997. Alternative solutions to radical problems. *Trends in Plant Sciences* 2: 289–290.
- Millar, T. M., Stevens, C. R. and Blake, D. R. 1998. Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischaemia. *Biol. Soc. Transac*, 25: 528.
- 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.
- Modolo, L. V., Cunha, F. Q., Braga, M. R. and Salgado, I. 2002. Nitric oxide synthasemediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiology* 130: 1288–1297.
- 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.
- Moncada, S., Palmer, R. M. and Higos, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43: 109-142.
- 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.
- Nappi, A. J. and Vass, E. (2001). The effects of nitric oxide on the oxidations of L-Dopa and dopamine mediated by tyrosinase and peroxidase. *J. Biol. Chem.*, 276: 11214-11222.
- Navarre, D. A., Wendehenne, D., Durner, J., Noad, R. and Klessig, D. F. 2000. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiology* 122: 573–582.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A. and Hancock, J. T. 2002a. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiology* 128: 13–16.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. and Hancock, J.T. 2002b. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1237–1242.
- 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.
- Niklas, K. J. 1997. *The evolutionary biology of plants*. The Chicago University Press, Chicago.

- Ninnemann, H. and Maier, J. 1996. Indication for the occurrence of nitric oxide synthase in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry Photobiology* 64: 393–398.
- Nose, M., Bernards, M. A., Furlan, M., Zajicek, J., Eberhardt, T. L., Lewis, N. G. (1995). Towards the specification of consecutive steps in macromolecular 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
- Orozco-Cardenas, M. L. and Ryan, C. A. 2002. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiology* 130: 487–493.
- Pagnussat, G., Simontachi, M., Puntarulo, S. and Lamattina, L. 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.*, 129: 954-56.
- Palevitz, B. A. and Lewis, R. (1998). Erectile dysfunction: serious research for a serious problem. *Scientist*, 12: 1.
- 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. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 9: 534-540.
- 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.
- Penson, S. P., Schuurink, R. C., Fath, A., Gubler, F., Jacobsen, J. V., et al. 1996. cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell*, 8: 2325-2333.
- Pesquet E, Jauneau A, Digonnet C, Boudet AM, Pichon M & Goffner D (2003) *Zinnia elegans*: the missing link from in vitro tracheary elements to xylem. *Physiol. Plantarum* 119: 463-468.
- 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 Tuominen H. 2013. Non-cell-autonomous postmortem lignification of tracheary elements in *Zinnia elegans*. *Plant cell* 25: 1314-1328.
- Pfeiffer, S., Janistyn, B., Jessner, G., Pichorner, H. and Ebermann, R. E. 1994. Gaseous nitric oxide stimulates guanosine-3,5-cyclic monophosphate formation in spruce needles. *Photochemistry*, 36: 259-262.

- Piatelli, M., Giudici de Nicola, M. and Castrogiovanni, V. 1969. Photocontrol of amaranthin synthesis in *Amaranthus tricolour*. *Photochemistry*, 8: 731-736.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rao, M. V. and Davis, K. R. 2001. The physiology of ozone induced cell death. *Planta* 213: 682–690.
- Reiter, C. D., Teng, R. J. and Beckman, J. S. 2000. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, 275: 32460-32466.
- Ribeiro, E. A., Cunha, F. Q., Tamashiro, W. M. S. C. and Martins, I. S. 1999. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Letters* 445: 283–286.
- Rippert P, Puyaubert J, Grisolle D, Derrier L, Matringe M (2009) Tyrosine and phenylalanine are synthesized within the plastids 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.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. and Kaiser, W. M. 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and invitro. *Journal of Experimental Botany* 53: 103–110.
- Rogers LA y Campbell MM. 2004. The genetic control of lignin deposition Turing plant growth and development. *New Phytol* 164: 17-30.
- 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, 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, 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. 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.
- Ros Barcelo, A, Pomar F, Ferrer MA, Martínez P, Ballesta MC, Pedreño MA. 2002. In situ characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiologia Plantarum* 114, 33±40.
- Ros Barceló, A. and Pomar, F. 2002. Plant peroxidases: versatile catalysts in the síntesis of bioactive natural products. *Studies in natural products chemistry*, vol., 27. Elsevier Science B. V.
- Ros Barceló, A., Pomar, F., Ferrer, M.A., Martínez, P., Ballesta, M.C. and Pedreño, M.A. (2002a) In situ characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiol. Plant*, 114, 33-40.
- Ros-Barceló, A., Pomar, F., López-Serrano, M., Martínez, P., & Pedreño, M. A. (2002). Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(4), 325-332.
- 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
- Rowland, A., Murray, A. J. and Welburn, A. R. (1985). Oxides of nitrogen and their impact upon vegetation. *Rev. Environ. Health*, 5: 295-342.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., et al. 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxinitrite dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.*, 269: 26066-26075.
- Ruel K, Berrio-Sierra J, Derikvand MM, Pollet B, The´venin J, Lapierre C, Jouanin L, Joseleau JP (2009) Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 184: 99–113.
- 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.

- Sakihama, Y., Nakamura, S. and Yamasaki, H. 2002. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* : an alternative NO production pathway in photosynthesis organisms. *Plant and Cell Physiology* 43: 290–297.
- 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.
- 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.
- Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M. and Waner, D. 2001. Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 627–658.
- Sen, S. and Cheema, I. R. 1995. Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embryonic tissue. *Biochemical Archives*, 11: 221-227.
- 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.
- Shibata, H., Kono, Y., Yamashita, S., Sawa, Y., Ochiai, H. And Tanaska, K. (1995). Degradation of chlorophyll by nitrogen dioxide generated from nitrite by the peroxidase reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1230: 45-50.
- 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.
- Siegel, -ltzcovich, J. 1999. Viagra makes flowers stand up straight. *West J. Med.*, 171: 38.
- Sinclair, J. 1987. Changes in spinach thylakoid activity due to nitrite ions. *Photosynth. Res.*, 12: 255-263.
- Smith A y Veitch NC. 1998. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr Opin Chem Biol* 2: 269-278.
- Song, F. and Goodman, R. M. 2001. Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 14: 1458–1462.
- 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.
- Stamler, J. S. 1994. Redox signalling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78: 931-936.
- Stamler, J. S., Singel, D. J. and Loscalzo, J. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-18902.
- 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.
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P. 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212: 835–841.
- 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. Inmunocytochemical 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.
- 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.
- Tams JW y Welinder KG. 1995. Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Anal Biochem* 228: 48-55.
- 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
- Tun, N. N., Holk, A. and Scherer, G. F. E. 2001. Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters* 509: 174–176.
- 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.
- Uchida, A., Jagendorf, A. T., Hibino, T., Takabe, T. and Takabe, T. (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.*, 163: 515-523.
- Van Camp, W., Inze, D. and Montagu, M. V. 1998. H₂O₂ and NO: redox signals in plant disease resistance. *Trends in Plant Science* 3: 330–334.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Halliwell, B. and Cross, C. E. (1997). Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalized oxidation of nitrite. *J. Biol. Chem.*, 272: 7617-7625.
- 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.
- 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.
- Vaucheret, H., Kronenberger, J., Lepingle, A., Vilaine, F., Boutin, J-P. and Caboche, M. 1992. Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. *Plant J.*, 2: 559-569.
- Veitch NC. 2004. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Rev* 3: 3-18.
- Vogt T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant.* 3: 2-20.
- Vranova, E., Inze, D. and Van Breusegem, F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 1227–1236.
- Wang Y, Chantreau M, Sibout R y Hawkins S. 2013. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Front. Plant. Scien.* 4: 1-14.
- Wang, X-Q, Ullah, H., Jones, A. M. and Assmann, S. M. 2001. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292: 2070–2072.
- Webb, A. A. R., Larman, M. G., Montgomery, L. T., Taylor, J. E. and Hetherington, A. M. 2001. The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *Plant Journal* 26: 351–362.
- Welburn, A. R. (1990). Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers? *New Phytol.*, 115: 395-429.
- 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.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F., Durner, J. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 177–183.
- Weng JK y Chapple C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist* 187: 273–285.
- Weng JK, Li X, Stout J, Chapple C (2008) Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7887–7892.
- Wildt, J., Kley, D., Rockel, A., Rockel, P. and Segschneides, H. J. 1997. Emission of NO from several higher plant species. *J. Geol. Res.*, 102: 5919-5927.
- Wilson IBH. 2002. Glycosilation of proteins in plants and invertebrates. *Curr Opin Struc Biol* 12: 569-577.
- Wink, D. A., Cook, J. A., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishne, M. C. and Mitchell, J. B. 1995. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.*, 82/83: 221-226.
- Xian, M., Li, X., Tang, X., Chen, X., Zheng, Z., Galligan, J. J., Kreulen, D. L. and Wang, P. G. (2001). N-Hydroxy-derivatives of guanidine based drugs as enzymatic NO donors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11: 2377-2380.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Takahashi, S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.*, 4: 128-129.
- Yang BY, Gray JSS y Montgomery R. 1996. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Res* 287: 203-212.

- 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.
- Yonetani, T., Yamamoto, H., Erman, J. E., Leigh, J. S., Jr., and Reed, G. H. (1972). Electromagnetic properties of hemoproteins. *J. Biol. Chem.*, 247: 2447-2455.
- 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, 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, 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.
- 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.