



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ESTUDIO Y PURIFICACIÓN DE PEROXIDASAS
IMPLICADAS EN LA LIGNIFICACIÓN DE
PLANTAS BASALES

Memoria presentada por la
Lcda. Teresa Martínez Cortés
para aspirar al grado de Doctor

A Coruña, 2013

Esperanza Cerdán Villanueva, coordinadora del doctorado de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña

Certifica:

Que la licenciada Teresa Martínez Cortés, ha realizado el trabajo “Estudio y purificación de peroxidasas implicadas en la lignificación de plantas basales” bajo la dirección de la Dra. Esther Novo Uzal, la Dra. Fuencisla Merino de Cáceres y el Dr. Federico Pomar Barbeito, en la Facultad de Ciencias de A Coruña, y bajo su supervisión, considerándolo concluido y autorizando su presentación al Tribunal Calificador.

Y para que conste expide y firma el presente certificado en A Coruña a 19 de Julio 2013.

Fdo: Esperanza Cerdán Villanueva

Dña. Esther Novo Uzal, contratada Juan de la Cierva de la Universidad de Murcia, Dña Fuencisla Merino de Cáceres, profesora honoraria y D. Federico Pomar Barbeito, profesor titular del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidade da Coruña.

Certifican:

Que la presente memoria, titulada “Estudio y purificación de peroxidases implicadas en la lignificación de plantas basales” presentada por la licenciada Teresa Martínez Cortés ha sido realizada en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de A Coruña bajo su dirección y hallándose concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal Calificador.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación a 19 de Julio 2013.

Fdo: Esther Novo Uzal

Fdo: Fuencisla Merino de Cáceres

Fdo: Federico Pomar Barbeito

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto INCITE08PxIB103182PR de la Xunta de Galicia. Durante la realización de esta tesis, la firmante de esta memoria ha disfrutado de un contrato asociado al proyecto anteriormente citado y una subvención para estancias de movilidad de estudiantes en el marco de estrategias institucionales de formación doctoral de las Universidades y de consolidación de los programas de Doctorado con Mención hacia la Excelencia del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Una parte de los resultados han sido publicados en:

Publicaciones:

Martínez-Cortés T, Pomar F, Espiñeira JM, Merino F, Novo-Uzal E. (2012) Purification and kinetic characterization of two peroxidases of *Selaginella martensii* Spring. involved in lignification. *Plant Physiology and Biochemistry* 52: 130-139

Congresos:

Martínez-Cortés T, Espiñeira JM, Pomar F, Merino F, Novo-Uzal E. (2011) "Purification and biochemical characterization of two peroxidases from *Selaginella martensii* Spring". XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV)-XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Castellón de la Plana. Participación mediante póster.

Martínez-Cortés T, Espiñeira JM, Merino F, Pomar F, Novo-Uzal E. (2012) "Análisis proteómico de dos peroxidases de tipo siringilo de *Selaginella martensii*". III Jornadas bienales de jóvenes investigadores en proteómica. Santiago de Compostela. Participación mediante póster.

Novo-Uzal E, Gutiérrez J, **Martínez-Cortés T**, Gómez-Ros LV, Espiñeira JM, Esteban-Carrasco A, Pomar F. (2012). The basic peroxidase of *Zinnia elegans* is upregulated by auxins and cytokinins and its function is conserved in plant evolution. Plant Vascular Development Conference. Viena (Austria). Participación mediante póster.

Martínez-Cortés T, Pomar F, Merino F, Novo-Uzal E. (2013). A proteomic approach to *Physcomitrella patens* root exudates. XX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV)-XIII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Lisboa (Portugal). Comunicación oral.

Martínez-Cortés T, Pomar F, Espiñeira JM, Merino F, Novo-Uzal E. (2013). Biochemical and molecular characterization of a peroxidase induced upon saline stress in *Physcomitrella patens*. XX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV)-XIII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Lisboa (Portugal). Participación mediante póster.

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todos aquellos que me han apoyado y contribuido a que se lleve a cabo esta tesis doctoral.

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

A la catedrática Fuencisla Merino, de la cual nunca olvidaré sus lecciones. Muchas gracias por haberme aceptado cuando aún estaba en mitad de la carrera para empezar a colaborar en el grupo de investigación y sobre todo muchas gracias por haber confiado en mí.

Al doctor Federico Pomar, que me ha enseñado que la paciencia y el optimismo son dos armas muy poderosas para afrontar los problemas, muchas gracias por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, fueran o no las correctas.

A la doctora Esther Novo, a la cual no es posible expresar todo lo que le debo. Muchas gracias por estar siempre dispuesta a tender una mano y por demostrar ser una persona capaz no solo de afrontar los retos más difíciles, sino de lograrlos. Gracias por todo lo que me has enseñado y por los buenos momentos que, espero, continúen.

A la doctora Mariana Sottomayor, por acogerme como una más en su laboratorio y preocuparse por mí constantemente.

Al doctor José Díaz por todos los consejos y ayudas recibidas y también por los chistes, que aunque malos, alegran el día.

A las doctoras M^a Ángeles Bernal y Cristina Silvar por todos los consejos recibidos, y por haberme ayudado siempre que lo he necesitado.

A todos mis compañeros de laboratorio, con los cuales he compartido penas, alegrías, precipitaciones y esperanzas, pero lo que más, mucha diversión. Javi, muchas gracias por tus consejos, charlas y cafés, estoy convencida que a ese Genio que tienes le quedan muchos deseos que

concederte. Jorge, siempre has estado dispuesto a echarme una mano con cualquier cosa y a ofrecerme consejo, y aunque a veces no hemos estado de acuerdo, he aprendido muchas cosas de ti, muchas gracias por todo. José Manuel, gracias por haberme ayudado a dar mis primeros pasos dentro del laboratorio, siempre recordaré tus enseñanzas y sobre todo el significado de la palabra “equipo”, créeme, eso siempre irá conmigo. Tania, Javier, Susana, Alba, muchas gracias por vuestra compañía, y el apoyo recibido.

A Lorena, Fran y Joaquín, por la compañía en las largas jornadas laborales y las breves jornadas festivas, pero sobre todo, por la amistad que me han brindado.

A todos los compañeros de Porto; Patricia, Inés, Sara, Mafe y Fran, muchas gracias por vuestra acogida y por tratarme como una más. Siempre os recordaré cuando vea “Pacos”, “Muñecos de nieve” o “Princesitas”.

Gracias a la gente de otros laboratorios de la facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña, que han estado siempre dispuestos a ayudar, especialmente a Bioquímica.

Al Dr. Jesús Mateos del INIBIC (Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña), muchas gracias por tu valiosísima ayuda en el análisis proteómico de mis muestras y por todos los consejos recibidos.

A todos mis amigos, por entenderme siempre y por darme vuestro apoyo, habeis sido fundamentales para llegar hasta aquí. Tamara, gracias por todos los momentos y tés compartidos, espero que puedan ser muchos más. Laura, Cris y Rafa, muchas gracias por todo, me habeis enseñado que nada es imposible y que las cosas dependen de uno mismo más que nada. Aitana, siempre has estado a mi lado, y espero que siga así muchos años más, aunque en el futuro sea en la distancia.

A mi familia, por haberme apoyado siempre y haberme ofrecido su ayuda. Sin vosotros no me hubiera sido posible acabar esta tesis y por eso os lo agradeceré siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
I. Ligninas	9
I.I. La lignificación y la colonización terrestre	9
I.II. Naturaleza, composición y localización	17
I.III. Biosíntesis de las ligninas	20
I.IV. Evolución de las ligninas	22
II. Peroxidasas	27
II.I. Naturaleza y estructura	28
II.II. Funciones	30
II.III. Polimorfismo	31
II.IV. Localización tisular y subcelular	33
II.V. Papel fisiológico en la lignificación	34
II.VI. Evolución de peroxidasas siringilo	37
OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	47
I. Material vegetal	49
I.I. <i>Marchantia polymorpha</i> (L.)	49
I.II. <i>Physcomitrella patens</i> ([Hedw.] Bruch & Schimp.)	50
I.III. <i>Selaginella martensii</i> (Spring)	52
II. Localización histoquímica de peroxidasas y ligninas	53
III. Extracción de proteínas totales	54
IV. Purificación de peroxidasas	55
IV.I. Precipitación con sulfato amónico	55
IV.II. Purificación parcial de peroxidasas de <i>M. polymorpha</i>	56
IV.II.I. Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow	56
IV.II.II. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP-Sefarosa™ Fast Flow	57
IV.III. Purificación de peroxidasas de <i>P. patens</i>	58
IV.III.I. Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow	58
IV.III.II. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP-Sefarosa™ Fast Flow	58
IV.IV. Purificación de peroxidasas de <i>S. martensii</i>	59
IV.IV.I. Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow	59
IV.IV.II. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP-Sefarosa™ Fast Flow	59
V. Determinación de la actividad peroxidasa	60
VI. Determinación de la cantidad de proteínas	61
VII. Análisis electroforéticos	61
VII.I. Isoelectroenfoque en placa	61
VII.II. Electroforesis disociante (SDS-PAGE)	62
VIII. Análisis de datos cinéticos	64
IX. Tratamientos de los cultivos líquidos de <i>P. patens</i>	64
X. Extracción y cuantificación de fenoles	65
XI. Análisis proteómicos	65

XI.I. Determinación del peso molecular mediante MALDI-TOF MS	66
XI.II. Digestión de proteínas con tripsina y adquisición de espectros MS/MS	66
XI.III. Precipitación de proteínas del secretoma radicular de <i>P. patens</i>	67
XI.III.I. Fraccionamiento en gel	68
XII. Técnicas bioinformáticas	69
XII.I. Búsqueda de secuencias homólogas	69
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
Estudio de las peroxidasas relacionadas con la lignificación en briófitos	73
I. Estudio de las peroxidasas relacionadas con la lignificación en <i>Marchantia polymorpha</i>	75
I.I. Localización histoquímica de peroxidasas y ligninas	77
I.II. Estudio de las peroxidasas de <i>M. polymorpha</i>	78
I.III. Purificación parcial de peroxidasas básicas de <i>M. polymorpha</i>	81
I.IV. Especificidad de sustrato	85
II. Estudio de las peroxidasas básicas de <i>Physcomitrella patens</i>	89
II.I. Estudio de las peroxidasas de <i>P. patens</i>	91
II.II. Purificación de peroxidasas básicas de <i>P. patens</i>	93
II.III. Identificación de las proteínas de PpPrx por MALDI-TOF MS/MS	96
II.IV. Dependencia del pH	99
II.V. Especificidad de sustrato	100
II.VI. Caracterización cinética	101
II.VII. Efecto del estrés en suspensiones líquidas de <i>P. patens</i>	102
II.VII.I. Tratamientos que activan la señalización del ABA	103
II.VII.I.I. Análisis de la variación del pH	105
II.VII.I.II. Efecto sobre la actividad peroxidasa	107
II.VII.I.III. Efecto sobre el patrón proteico	108
II.VII.I.IV. Efecto sobre la biosíntesis de fenoles	110
II.VII.II. Tratamiento que activa la respuesta de defensa frente al ataque de patógenos	112
II.VII.II.I. Análisis de la variación del pH	114
II.VII.II.II. Efecto sobre la actividad peroxidasa	114
II.VII.II.III. Efecto sobre el patrón proteico	116
II.VII.II.IV. Efecto sobre la biosíntesis de fenoles	117
II.VII.III. Tratamiento que activa la ruta de estrés por ROS	118
II.VII.III.I. Análisis de la variación del pH	119
II.VII.III.II. Efecto sobre la actividad peroxidasa	121
II.VII.III.III. Efecto sobre el patrón proteico	122
II.VII.III.IV. Efecto sobre la biosíntesis de fenoles	124
II.VIII. Caracterización del secretoma radicular	125
II.VIII.I. Extracción proteica	125
II.VIII.II. Identificación de las proteínas	127
II.VIII.II.I. Estrés / Defensa	128
II.VIII.II.II. Modificación de la pared celular	133
II.VIII.II.III. Senescencia	136
II.VIII.II.IV. Obtención de energía	138

II.VIII.II.V. Regulación	140
II.VIII.II.VI. Transducción de señal	142
II.VIII.II.VII. Proteínas desconocidas y de función desconocida	144
II.VIII.III. Proteínas en el desarrollo	144
Estudio de las peroxidasas relacionadas con la lignificación en pteridófitos	147
III. Estudio de las peroxidasas relacionadas con la lignificación en <i>Selaginella</i>	
<i>martensii</i>	149
III.I. Localización histoquímica de peroxidasas y ligninas	151
III.II. Estudio de las peroxidasas de <i>S. martensii</i>	152
III.III. Purificación de peroxidasas	154
III.III.I. Purificación de SmaPrx1	158
III.III.II. Purificación de SmaPrx2	160
III.III.III. Purificación de SmaPrx3	162
III.IV. Análisis espectral	164
III.V. Determinación del peso molecular	165
III.VI. Dependencia del pH	166
III.VII. Especificidad de sustrato	167
III.VIII. Caracterización cinética	169
III.IX. Identificación de SmaPrx2 y SmaPrx3 por MALDI-TOF MS/MS	172
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	183

RESUMEN

The colonization of the terrestrial environment by plants has led to the development of different mechanisms which allow the survival in a hostile environment. One of these adaptations has been the occurrence of lignins and lignification process that gave plants the necessary improvement to stay upright and an efficient water transport.

The first organisms to colonize land were non-vascular plants, these species were structurally simple but had the ability to adapt to new environment because of their high resistance to stress. These first plants were classified as bryophytes and divided into three groups; liverworts, mosses and hornworts. Bryophytes do not have a vascular system and most of them do not have lignin. However, there are some exceptions such as the liverwort *Marchantia polymorpha* which possesses guaiacyl and syringyl lignins. The moss *Physcomitrella patens* also represents an exception, even though it does not contain lignins, it has the ability to oxidize coniferyl and sinapyl alcohols, which are linked to the biosynthesis of guaiacyl and syringyl units. The earliest vascular plants were pteridophytes, which contain predominantly guaiacyl lignins in their cell wall. However, numerous exceptions have been recently found, such as *Selaginella martensii*, which contains 70% syringyl lignins with a lower proportion of guaiacyl units, a typical feature of angiosperms. Furthermore, this production of syringyl lignins occurs through a novel mechanism of synthesis, in which two new enzymes have been developed to supplement the lack of ferulate 5-hydroxylase and caffeic acid 3-O-methyltransferase, the necessary enzymes for the production of syringyl lignins. These features make the study of these three species of great interest in the syringyl lignin biosynthesis. Moreover, basic peroxidases have been characterized as responsible for the oxidation of sinapyl alcohol in several works. Therefore, it is necessary a deep study of basic peroxidases present in these three non angiosperms species.

By means of histochemistry, *M. polymorpha* showed a colocalization of peroxidase activity and lignins in its rhizoids. Furthermore, isoelectrofocusing analysis determined a coincidence between some basic peroxidases with the peroxidase of *Z. elegans* responsible of lignification. Therefore, peroxidases of

M. polymorpha were purified using a three-step protocol which included ammonium sulfate precipitation, adsorption chromatography on Phenyl Sepharose and cationic exchange chromatography on SP Sepharose. A fraction enriched in basic peroxidases presented the ability to oxidize coniferyl and sinapyl alcohols and ferulic acid. These features support the fact that these peroxidases are involved in lignification of this species.

P. patens is a species without lignins, but it presents phenolic compounds known as lignin-like. The purification of peroxidases was achieved in a three-step protocol, like in the purification of *M. polymorpha*. This process enabled us to isolate a peroxidase (PpPrx) with an isoelectric point of 10.04 and a molecular weight of 36.5 kDa. This peroxidase was able to oxidize both coniferyl and sinapyl alcohols. In addition, the kinetic analysis showed a high catalytic efficiency against coniferyl alcohol, similar to other peroxidases involved in lignification of other species. To check how this enzyme acts against several abiotic stresses, plants of *P. patens* were treated in liquid culture with compounds that activate the signaling pathway of ABA (abscisic acid, sodium chloride and mannitol), a compound involved in the response to pathogens (salicylic acid) and a compound that activates the path of oxidative stress (hydrogen peroxide).

The culture medium pH, total peroxidase activity, protein and peroxidase patterns and biosynthesis of phenols were analysed after the different treatments. Interestingly, the purified peroxidase PpPrx was induced with sodium chloride and hydrogen peroxide treatments, whereas it was inhibited by abscisic acid and mannitol treatments.

In addition, the rhizoid secretome of *P. patens* was studied in two stages of development in order to check which proteins were secreted into the culture medium by rhizoids under normal conditions. A total of 47 proteins in cultures of 7 days and a total of 67 proteins at 28 days were identified. These proteins were clustered into different groups based on their involvement in diverse processes such as cell wall modification, senescence or regulation.

In *S. martensii*, histological sections showed a colocalization of peroxidase activity and lignin. Whereas guaiacyl lignins were located in the xylem, syringyl lignins were located in the epidermis and sub-cortical epidermis. a purification protocol was performed in three steps as described above for *M. polymorpha*. Three basic peroxidases were obtained; one semipurified (SmaPrx1) and two proteins purified to homogeneity (SmaPrx2 and SmaPrx3). SmaPrx1 fraction showed a basic isoelectric point and molecular weight between 35 and 45 kDa, typical of class III peroxidases. Moreover, activities against several substrates suggest that these peroxidases are involved in lignification. The molecular mass for SmaPrx2 and SmaPrx3 was calculated to be 36.3 kDa and 45.6 kDa, respectively, according to MALDI-TOF/TOF. Both enzymes show a typical peroxidase UV-visible spectrum with a Soret peak at 403nm for SmaPrx2 and 404nm for SmaPrx3. The specific activities showed against several substrates and the kinetic parameters suggest SmaPrx2 and SmaPrx3 have specific roles in cell wall formation and especially in lignin biosynthesis. Several peptides from tryptic digestion of both peroxidases were identified through MALDI-TOF MS/MS. The presence in these peptides of structural determinants typical of syringyl peroxidases indicates these proteins show no structural restrictions to oxidize syringyl moieties. These data, along with the *in vitro* capacity of using sinapyl alcohol as substrate and the low K_M in the μM range suggest these two peroxidases may be responsible for the oxidation of syringyl monolignols that leads to syringyl lignin biosynthesis.

INTRODUCCIÓN

I. Ligninas

Las ligninas representan el compuesto orgánico más abundante sobre la superficie de la tierra después de la celulosa, y constituyen alrededor del 25% de la biomasa vegetal (Higuchi, 1990). Se encuentran en las plantas vasculares, desde las más modernas (angiospermas y gimnospermas) hasta las más ancestrales, los pteridófitos (helechos, licófitos y equisetos). Recientemente, también se ha descrito la presencia de ligninas en plantas no vasculares, como el briófito *Marchantia polymorpha* (Españeira *et al.*, 2011) y el alga roja *Calliarthron cheilosporioides* (Martone *et al.*, 2009). El desarrollo de las ligninas en las plantas pudo haber jugado un papel clave en la colonización del medio terrestre por las plantas durante la transición del Ordovícico al Silúrico, que tuvo lugar hace 400 a 450 millones de años (Niklas, 1997).

I.I. La lignificación y la colonización terrestre

Los briófitos constituyen el primer clado de plantas en abandonar el agua para colonizar el ámbito terrestre. Sin embargo, los briófitos no muestran un auténtico sistema vascular, sino que contienen células especializadas en las que se ha eliminado el contenido citoplasmático facilitando así el transporte de agua. Este sistema conductor parece haber evolucionado de forma independiente al de las plantas vasculares. Al igual que en el resto de las plantas terrestres, los tejidos conductores de sustancias orgánicas están compuestos por células con citoplasma interconectadas por numerosos plasmodesmos. Sin embargo, la especialización de estos tejidos no implica la degradación del núcleo, a diferencia de lo que ocurre en el floema de las plantas vasculares (Ligrone *et al.*, 2000).

El tipo celular más especializado del sistema conductor de los briófitos, son los leptoides, que aparecen en los musgos del clado politricales, y que presentan paredes nacaradas y placas cribosas con plasmodesmos. Existe cierta controversia acerca de si deben considerarse como leptoides las células que aparecen en otros grupos de musgos, como en el género *Funaria* (Ligrone

et al., 2000). Además, se ha documentado en algunas especies de musgos y hepáticas la presencia de un parénquima conductor, con células poco especializadas pero con punteaduras primarias en sus paredes (Cortella *et al.*, 1994; Ligrone *et al.*, 2000)

La lignificación del xilema de las plantas vasculares durante la evolución de éstas a comienzos del Devónico fue uno de los factores que determinaron la colonización de la superficie terrestre por estos organismos originariamente acuáticos, ya que se hicieron más eficaces en la absorción de la luz incidente y en el acceso directo a nuevas fuentes de nutrientes, tan limitantes en el medio acuático (Fig. 1).

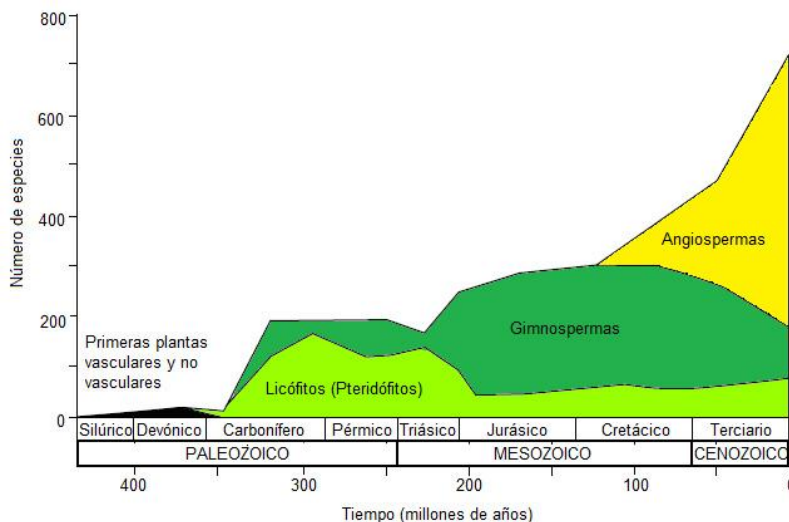


Figura 1. Registro fósil de aparición de los diferentes clados de plantas vasculares. Modificado de Willis y McElwain (2002).

El xilema constituye una vía de baja resistencia para el transporte del agua en las plantas vasculares. El sistema vascular desarrollado por las plantas superiores transporta el agua eficazmente desde los lugares de absorción en la raíz hasta las superficies de evaporación en las hojas, estando los elementos diferenciados del xilema revestidos internamente de ligninas. El 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).

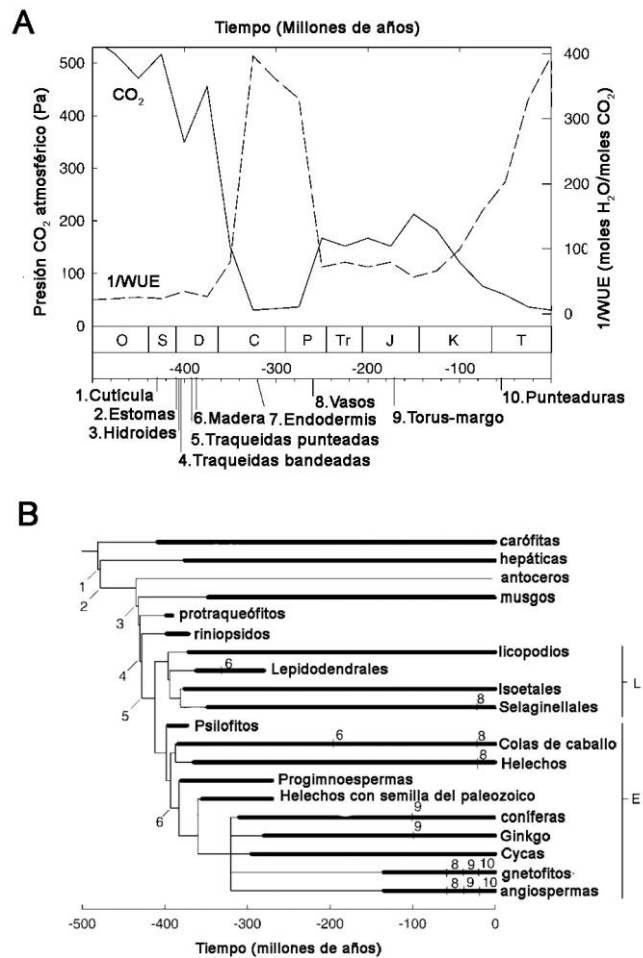


Figura 2. Concentración de CO_2 atmosférico (línea continua) y moles de agua transpirado por moles de CO_2 fijado (inverso de la eficiencia del uso del agua, línea discontinua) (A). Relaciones hipotéticas entre fósiles y plantas actuales (B). Las líneas gruesas indican la presencia en el registro fósil. Las barras verticales de la derecha indican los clados licófito (L) y euilófito (E) de plantas vasculares. Modificado de Sperry (2003).

La necesidad de agua de la planta está determinada por la tasa de transpiración que se produce en el intercambio gaseoso, mientras que los requerimientos de agua para la fotosíntesis y el crecimiento son, en comparación, de menor importancia. El uso eficiente del agua para la fotosíntesis en las plantas terrestres pudo haber sufrido fluctuaciones, hasta cierto punto por ajustes en la temperatura foliar y la capacidad fotosintética (Lambers *et al.*, 1998), de tal forma que el rango de cambios fisiológicos pudo estar dictado por las concentraciones de CO₂ atmosférico (Fig. 2).

La colonización de la tierra y el origen de los más importantes clados durante el inicio del Carbonífero fueron facilitados por niveles muy altos de CO₂ atmosférico (Sperry, 2003). Estas condiciones pudieron favorecer a sistemas con una conductancia hidráulica relativamente baja y al mismo tiempo con alta capacitancia (capacidad para almacenar agua), una combinación fortuita que facilitó el origen de las plantas no vasculares y de las primeras plantas vasculares con capacidad de transporte necesariamente limitada y con buena capacitancia por las delgadas y elásticas paredes celulares del tejido parenquimático (Sperry, 2003).

Esas primeras plantas terrestres fueron necesariamente poiquilohídricas (con gran variación en su contenido hídrico) y equilibraban su potencial hídrico con fuentes de agua muy próximas (Raven, 1987), por lo que dependían de su capacidad de almacenamiento de agua para prolongar los períodos de hidratación. La tolerancia a la desecación, tan común en los modernos briófitos y algas verdes terrestres es, indudablemente, una estrategia ancestral esencial para la supervivencia en la tierra, en ausencia de un sistema especializado de aporte de agua (Oliver, 1996). La evolución de las plantas de poiquilohídricas a homeohídricas (con capacidad para controlar el contenido de agua) se asoció con el descenso de la tolerancia a la desecación de las células vegetativas (Oliver, 1996). Este cambio en la capacidad de retención de agua, favorecida por la lignificación de las paredes celulares, condujo a un incremento en el tamaño de las plantas (Niklas, 1990; 1994).

La inevitable capilaridad en las plantas no vasculares derivó en las plantas vasculares hacia un sistema de conducción del agua por medio de

esqueletos de células muertas. La alta conductividad por unidad de superficie proporciona cuatro ventajas: (1) menor inversión en el transporte de agua, particularmente porque los conductos muertos no requieren mantenimiento, (2) potencial para transportar el agua de manera más eficaz a mayores distancias y así dar origen a plantas de mayor tamaño, (3) menor estrés dinámico, y (4) altas tasas de difusión de CO₂ (Sperry, 2003). Esas innovaciones fueron acompañadas inicialmente de células conductoras de agua, presentes en el registro fósil desde hace 410 millones de años.

Estas células eran unos conductos sencillos de pequeño calibre, con débiles paredes perforadas como los que aparecían en los, ahora extintos, protraqueófitos *Aglaophyton* y *Horneophyton* (Fig. 3) (Kenrick y Crane, 1991). Son un tipo de sistemas que recuerdan a los hidroides (Fig. 4) de algunos musgos actuales y pueden tener un ancestro común (Mishler y Churchill, 1984; Kenrick y Crane, 1997). Esos tubos fósiles no parecen haber estado lignificados pero pudieron haber sido impregnados con polifenoles relacionados con las ligninas, como también sucede en los actuales hidroides (Ligrone *et al.*, 2000).

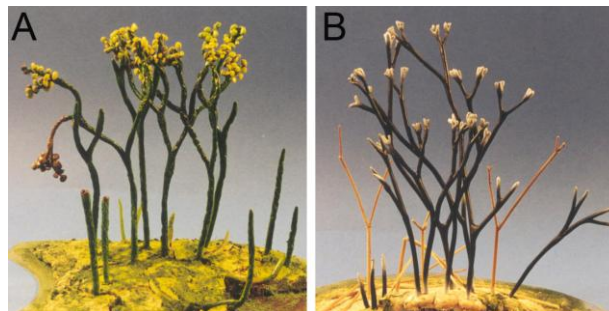


Figura 3. Protraqueófitos extintos que tenían delgados y sencillos conductos con paredes perforadas, como los hidroides de los musgos actuales. *Aglaophyton* (A) y *Horneophyton* (B).

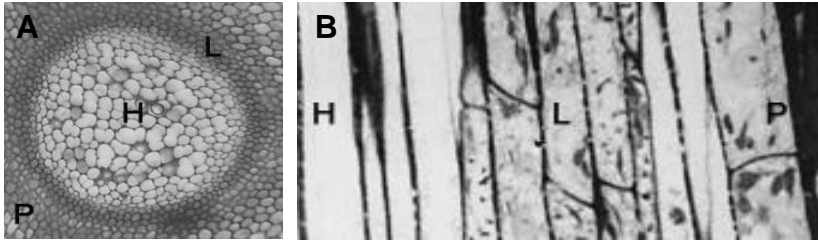


Figura 4. Sección transversal del cilindro central de *Dendroligotrichum dendroides* (A) y sección longitudinal de *Polytrichum commune* (B), donde se observan los hidroides (H) rodeados por un anillo de leptoides (L) y más externamente el parénquima (P). Tomado de Ligrone *et al.* (2000).

En la evolución hacia los traqueófitos se desarrollaron las traqueidas, conductos simples con paredes ornamentadas y lignificadas bandeadas o perforadas (Kenrick y Crane, 1997; Doyle, 1998). La función original de las ligninas y las paredes secundarias en las plantas probablemente fue apoyar estos elementos traqueales (Raven, 1987), de modo que la lignificación de las plantas vasculares del principio del Devónico estaba limitada a los elementos traqueales de una protoestela (un cordón cilíndrico en el centro del tallo), lo que indica que el papel de las ligninas en estas plantas no implica un soporte mecánico. Estas plantas fueron pequeñas y capaces de mantener el equilibrio hidrostático dentro de la propia planta (Vincent y Jeronimidis, 1991; Niklas, 1994).

Las primeras plantas vasculares tienen una mayor concentración de ligninas adyacentes al lumen celular (Friedman y Cook, 2000), situación que se invierte en las plantas superiores, en las que la mayor concentración de lignina está en la lámina media alcanzando valores mucho menores en el lumen (Donaldson, 2001).

La membrana perforada de las plantas actuales es homóloga a la región no lignificada de la pared primaria situada entre los engrosamientos del protoxilema (Mauseth, 1988). Las traqueidas bandeadas de los licófitos parecen una mejora de las de *Rhyniopsida*, una clase de plantas vasculares tempranas extintas, por la localización de los grandes poros (Kenrick y Crane,

1991) sobre delgadas áreas y el alineamiento de esas zonas entre traqueidas adyacentes (Fig. 5).

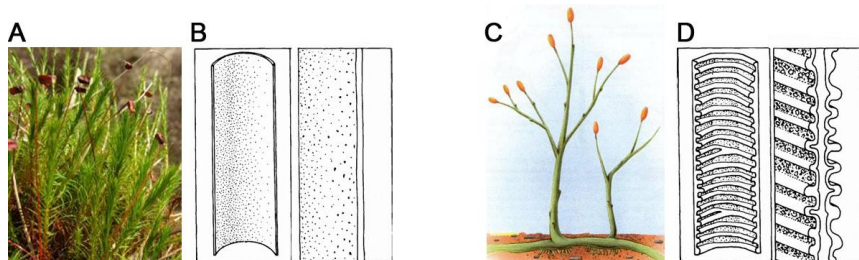


Figura 5. Morfología de los conductos de agua en los musgos y en las primeras plantas fósiles. *Polytrichum commune* e hidroides (A y B), *Rhytnia* y detalle de los engrosamientos bandeados en las traqueidas típicas de esta especie (C y D). Modificado de Kenrick y Crane (1997).

Las primeras traqueidas perforadas tienen bandas bordeadas escalariformes que recuerdan a las modernas traqueidas perforadas. La membrana de perforación está perfectamente definida y no lignificada, lo que podría maximizar la permeabilidad. En progimnospermas del Devónico tardío aparecen ya perforaciones circulares bordeadas con membranas delgadas y homogéneas (Beck *et al.*, 1982). El único tipo de conducto del xilema presente en el registro fósil durante los primeros 140 millones de años de evolución vascular son las traqueidas con perforaciones sencillas (Niklas, 1985). Durante el mismo período, la superficie total de traqueida por superficie de tejido se incrementa en asociación con la más compleja anatomía estelar (Niklas, 1984; Roth-Nebelsick *et al.*, 2000).

Los primeros elementos vasales fósiles son muy similares a los vasos de los modernos gnetófitos y han evolucionado a partir de las traqueidas con perforaciones bordeadas (Li *et al.*, 1996). El origen de un nuevo tipo de xilema conductor puede haber sido provocado por las variaciones en la concentración de CO₂ durante la última parte del Carbonífero y la primera del Pérmico. Desde el punto de vista del desarrollo y de la fisiología, el cambio de la producción de traqueidas a la producción de fibras y elementos vasales pudo ser muy simple,

requiriendo simplemente auxinas y giberelinas durante la diferenciación (Aloni *et al.*, 2000).

El sistema vascular ha evolucionado desde una protostela simple en el cual el tejido vascular está situado en una posición central, hacia sistemas más complejos en los que la parte central está ocupada por la médula y los haces vasculares se sitúan en la periferia como las sifonostelas y las eustelas (Fig. 6). Estos haces vasculares más modernos, ambos originados a partir de las protostelas podrían estar relacionados con el desarrollo de apéndices laterales de las plantas modernas (Wight, 1987; Stein, 1993).

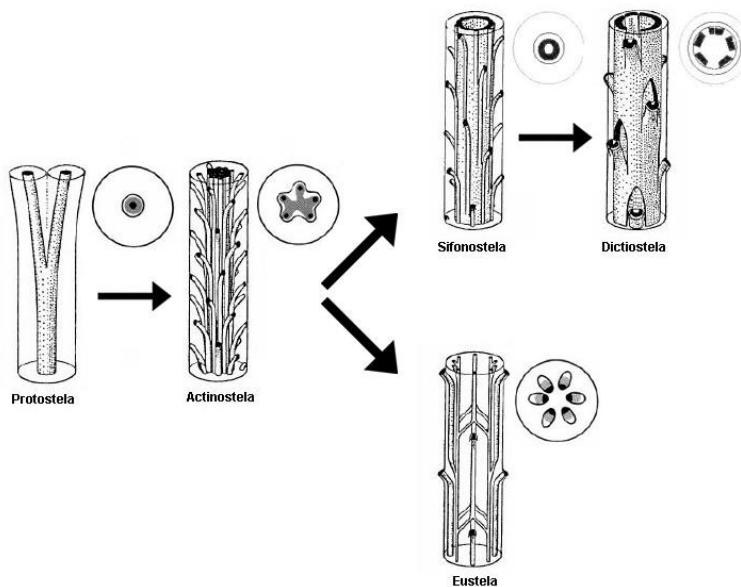


Figura 6. Teoría estélica. Modelo de evolución del sistema vascular de las plantas.

Debido a las características otorgadas por la lignificación, la biosíntesis de ligninas ha tenido una gran importancia para las plantas, que son capaces de emplear la biosíntesis de ligninas para conducir el carbono desde el metabolismo primario al secundario. La adquisición evolutiva de la ruta

fenilpropanoide ha jugado un papel clave en la capacidad de las plantas para colonizar la tierra, no solo 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. De hecho se cree que una de las primeras funciones de la lignina fue la protección contra los patógenos y la radiación UV (Raven, 1984; Speck y Vogellehner, 1988; Boyce *et al.*, 2003; Ligrone *et al.*, 2008). Esta hipótesis está apoyada por la deposición de ligninas en la corteza y no en los tejidos de conducción de agua en las plantas ancestrales *Aglaophyton*, *Rhynia* y *Asteroxylon* (Boyce *et al.*, 2003). Los engrosamientos de la pared celular en las traqueidas de las primeras plantas vasculares no estaban lignificados y sólo más tarde en la evolución las ligninas se depositaron en los tejidos vasculares para formar las traqueidas modernas de plantas vasculares existentes (Boyce *et al.*, 2003).

I.II. Naturaleza, composición y localización

Las ligninas son heteropolímeros fenólicos tridimensionales que resultan del acoplamiento de tres alcoholes *p*-hidroxicinámicos (monolignoles), el alcohol *p*-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Vanholme *et al.*, 2010) (Fig. 7) en una reacción de oxidación mediada por peroxidasas y lacasas (Boudet *et al.*, 1995; Ros Barceló, 1997; Ralph *et al.*, 2004).

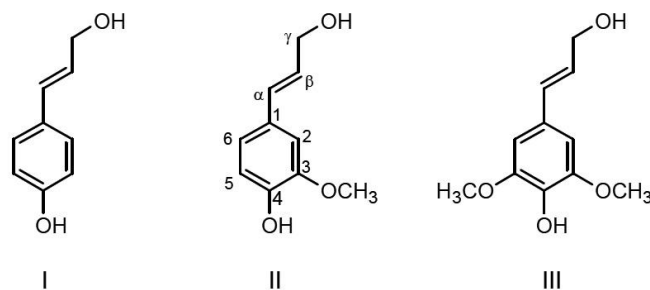


Figura 7. Estructuras de los alcoholes *p*-cumarílico (I), coniferílico (II) y sinapílico (III). Tomado de Ros Barceló *et al.* (2004).

Esta reacción produce un heteropolímero hidrofóbico, ópticamente inactivo (Ralph *et al.*, 1999), compuesto por unidades H (*p*-hidroxifenilo), unidades G (guayacilo) y unidades S (siringilo). El último paso de la biosíntesis de ligninas es la oxidación de monolignoles, llevada a cabo por lacasas (Berthet *et al.*, 2011) y, principalmente, peroxidasas (Fagerstedt *et al.*, 2010). Mientras que las lacasas sólo generan unidades G, las peroxidasas son capaces de oxidar monolignoles para producir unidades H, G y S (Berthet *et al.*, 2011).

Por lo general (Fig. 8), las ligninas de las angiospermas se componen de unidades G y S, mientras que en las gimnospermas las ligninas carecen de unidades S, y se componen principalmente de unidades G, con una proporción menor de unidades de H, aunque hay algunas excepciones (Novo-Uzal *et al.*, 2009a). Los helechos suelen presentar el mismo patrón que las gimnospermas, a pesar de que la presencia de unidades S se ha descrito anteriormente en algunas especies, especialmente en *S. martensii*, que contiene un 70% de unidades S (Gómez-Ros *et al.*, 2007a; Espiñeira *et al.*, 2011).

La deposición de las ligninas se centra mayoritariamente en las paredes de determinados tipos celulares como son las traqueidas, los vasos, las fibras del xilema y del floema y las esclereidas (Ros Barceló, 1997). Sin embargo, existe heterogeneidad en la naturaleza de una misma pared celular. De hecho, Donaldson (1985) encontró que la concentración de ligninas era del 16-27% en la pared celular secundaria, mientras que en la lámina media de coníferas era más elevada, del orden del 38-88%. Además, las ligninas depositadas en la lámina media y esquinas celulares son ricas en unidades H, mientras que en los engrosamientos secundarios predominan las unidades de tipo G (Terashima y Fukushima, 1989).

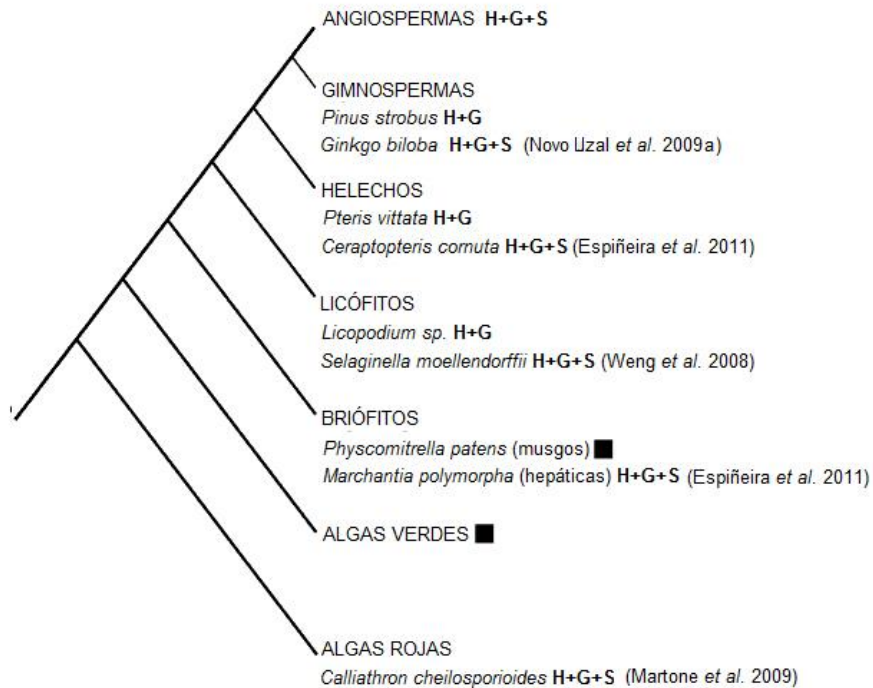


Figura 8. Árbol filogenético que muestra la composición de monómeros de ligninas entre los diferentes clados vegetales. Se evidencia que las ligninas de tipo S no son exclusivas de angiospermas. La distribución de ligninas de tipo S en licófitos, helechos y gimnospermas no es uniforme. Los cuadrados negros indican la ausencia de lignificación. H, monómeros *p*-hidroxifenilo, G, monómeros guayacilo y S, monómeros siringilo. Modificado de Li y Chapple (2010).

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

I.III. Biosíntesis de las ligninas

La biosíntesis de las ligninas se desarrolla a través de una larga secuencia de reacciones que implican tres posibles rutas: La ruta del sikimato (i) la ruta común fenilpropanoide (ii) y la ruta específica de la biosíntesis de ligninas (iii) (Fig. 9).

- i) La ruta del sikimato se inicia con el fosfoenol piruvato (PEP, un intermediario de la glucólisis) y eritrosa 4-fosfato (un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato) (Herrmann, 1995).
- ii) La ruta común fenilpropanoide comienza con la desaminación de la L-fenilalanina (y/o L-tirosina) por la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5). Participan también en esta ruta la cinamato-4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.13.11), la *p*-cumarato-3-hidroxilasa (C3'H), la hidroxicinamoil CoA (HCT) y las O-metil-transferasas (OMT) dependientes de S-adenosil-L-metionina, tales como la cafeoil-CoA-O-metiltransferasa (CCoAOMT, EC 2.1.1.104) y la *p*-hidroxicinamato CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12). Además de la producción de estos precursores de las ligninas, a partir de esta ruta también se producirán flavonoides y taninos.
- iii) La ruta específica de la biosíntesis de las ligninas. Tiene por finalidad la producción de los alcoholes cinamílicos a partir del *p*-cumaril aldehído, el coniferil aldehído y el sinapil aldehído. Las enzimas que participan en esta ruta son la *p*-hidroxicinamoil-CoA reductasa (CCR, EC 1.2.1.44) y la *p*-hidroxicinamil alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.195) en sus formas coniferil alcohol deshidrogenasa (CAD) y sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD), la ferulato-5-hidroxilasa (F5H) y la O-metil-transferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina (COMT) (Osakabe *et al.*, 1999; Franke *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000).

El último paso en el proceso de la biosíntesis de las ligninas es la oxidación de los alcoholes cinámicos en la pared celular para dar lugar a la formación de los correspondientes radicales 4-O-fenoxilo, los cuales polimerizan espontáneamente para dar dímeros y oligómeros y, en reacciones posteriores, un polímero creciente de lignina.

La ruta de biosíntesis de ligninas ha sido caracterizada en angiospermas, que poseen un metabolismo único para la producción de ligninas de tipo S, en el que participan dos enzimas clave, una monooxigenasa dependiente del citocromo P450 (F5H) y una O-metil-transferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina (COMT) (Fig. 9) (Weng y Chapple, 2010).

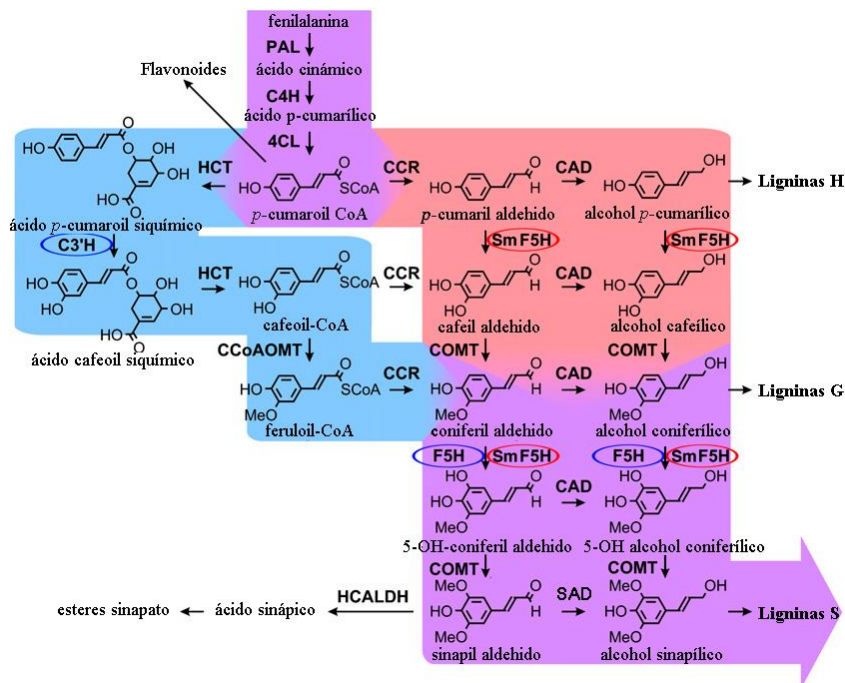


Figura 9. Ruta de biosíntesis de las ligninas en *Selaginella* y angiospermas. Las rutas compartidas entre *Selaginella* y angiospermas están sombreadas de color morado, mientras que las ramas divergentes específicas para las angiospermas y para *Selaginella* están coloreados de azul y rosa respectivamente. Los dos anillos aromáticos son catalizados por una enzima bifuncional SmF5H (rodeada en rojo) en *Selaginella* en lugar de las dos enzimas, C3'H y F5H de angiospermas (rodeadas en azul). Sm, *S. moellendorffii*; PAL, fenilalanina amonio-liasa; 4CL, 4-hidroxicinamoil-CoA ligasa; CCoAOMT, cafeoil-CoA O-metil transferasa; HCALDH, hidroxicinamaldehído dehidrogenasa; F5H, Ferulato 5-hidroxilasa; COMT, ácido cafeico O-metiltransferasa; CAD, (hidroxi)cinamil alcohol dehidrogenasa. Tomado de Weng *et al.* (2010).

Un caso especial es el de *S. moellendorffii*, un licófito que divergió hace más de 400 millones de años y que ha desarrollado la capacidad de producir tanto ligninas de tipo G como S mediante la aparición de una meta-hidroxilasa SmF5H, una enzima bifuncional con propiedades catalíticas (Weng *et al.*, 2008). Esta enzima, al igual que la F5H de angiospermas, es una monooxigenasa dependiente del citocromo P450 y es capaz de catalizar la 3-hidroxilación del *p*-cumaril aldehído y el alcohol *p*-cumarílico directamente. En *Selaginella* se ha descubierto una ruta no canónica de producción de ligninas (Fig. 9, rosa y violeta), en la que la SmF5H sustituye la acción de las enzimas C3'H y HCT de angiospermas (Fig. 9, azul) (Weng *et al.*, 2010). Sin embargo, la SmF5H no es ortóloga a la F5H de angiospermas, y a pesar de ser funcionalmente similares probablemente la SmF5H haya surgido en un proceso de evolución convergente (Weng *et al.*, 2008; 2010), por lo que la SmF5H es funcionalmente similar a la F5H de angiospermas pero independiente filogenéticamente.

Otra de las enzimas que participan en la síntesis de las ligninas de tipo S es la COMT, enzima que cataliza la O-metilación del quinto grupo hidroxilo del alcohol coniferílico para formar el alcohol sinapílico. En *S. moellendorffii* se ha descubierto una nueva COMT relacionada con la de angiospermas, pero con la particularidad de que los genes que codifican para la COMT y la SmF5H comparten una región de regulación que puede estar bajo el control de elementos reguladores *cis* (Weng *et al.*, 2011).

I.IV. Evolución de las ligninas

En un principio se descartó la idea de que las algas poseyeran ligninas en sus paredes celulares, sin embargo estudios recientes cuestionan la ausencia de ligninas en este grupo. Varios trabajos mantienen que algunas especies de algas pardas como *Cystoseira barbata* (Dovgan y Medvedeva, 1983) y *Fucus vesiculosus* (Reznicov *et al.*, 1978) contienen ligninas en cantidades superiores al 20% de su peso seco, pero estas identificaciones dependieron únicamente de la comparación de sus tiempos de retención

cromatográficos con los de los auténticos estándares fenilpropanoides. Posteriores trabajos para comprobar estos resultados (Ragan, 1984; Ragan y Glombitza, 1986) no han aportado evidencias de la presencia de estructuras fenilpropanoides derivadas de la lignina. Sin embargo, sí revelaron la presencia de polímeros derivados del floroglucinol. Así la aparición de compuestos similares a ligninas ha sido descrito para algunas algas (Delwiche *et al.*, 1989; Gunnison y Alexander, 1975), pero la presencia de ligninas verdaderas en las algas no se demostró hasta que Ligrone *et al.* (2008) y Martone *et al.* (2009) describieron la presencia de ligninas mediante inmunocitoquímica en el alga carofícea *Nitella flexilis* y mediante DFRC (derivación seguida de escisión reductora) en el alga roja *Calliarthron cheilosporioides*.

Sørensen *et al.* (2011) determinaron la composición de las paredes celulares de diversas especies de algas verdes del género *Coleochaete*, en las que revelaron la aparición de monómeros guayacilo y siringilo mediante tioacidolisis. A pesar de que la cantidad de monómeros fue baja se determinó también su presencia por inmunoanálisis, lo que indica que algún tipo de metabolismo fenilpropanoide surgió antes de la colonización del medio terrestre.

La gran heterogeneidad en la composición de ligninas entre grupos filogenéticos revela una separación entre el desarrollo del xilema y el sistema vascular. Este hecho, junto con el de haber detectado la presencia de ligninas de tipo S en *C. cheilosporioides* (Martone *et al.*, 2009) y *M. polymorpha* (Espiñeira *et al.*, 2011) demuestra que la presencia de ligninas de tipo S no está necesariamente unida a la presencia de xilema en las plantas. Todo esto sugiere que el mecanismo metabólico para la biosíntesis de monolignoles se desarrolló de manera temprana en la evolución (Weng *et al.*, 2010).

Para integrar esta nueva ruta evolutiva y la ruta general de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en el eficiente metabolismo de las plantas vasculares, las actividades de las enzimas de la ruta del sikimato están estrechamente coordinadas con las actividades de las enzimas de la ruta fenilpropanoide (Whetten y Sederoff, 1995). Así, la lignificación es considerada

como uno de los puntos clave en la evolución de las plantas, ya que evita la desecación de las mismas y les ha permitido colonizar la tierra, gracias a la resistencia mecánica y a la impermeabilización, que hace posible el transporte de solutos a través del xilema.

La presencia de compuestos semejantes a la lignina se ha descrito en algas carofíceas de los géneros *Coleochaete* y *Nitella*, en el alga coralina *C. cheilosporioides* y en briófitos como *M. polymorpha* (Delwiche *et al.*, 1989; Kroken *et al.*, 1996; Ligrone *et al.*, 2008; Martone *et al.*, 2009; Sørensen *et al.*, 2011), lo que implica que al menos parte de la ruta fenilpropanoide que finalmente llevó a la biosíntesis de lignina estaba presente en las algas (Fig. 10) (Boyce *et al.*, 2003).

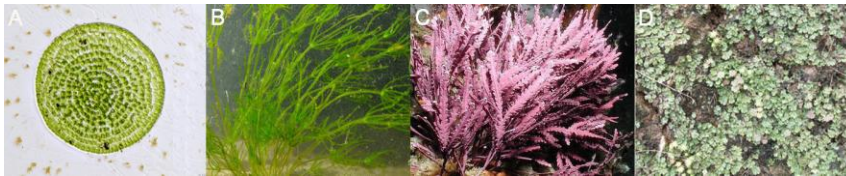


Figura 10. Algunas especies que mostraron la presencia de ligninas. *C. orbicularis* (A), *Nitella flexilis* (B), *C. cheilosporioides* (C), *M. polymorpha* (D).

Los análisis realizados con otros géneros de briófitos, *Dawsonia*, *Dendroligotrichum* y *Polytrichum* (Fig. 11) presentaron resultados positivos para el test de Mäule, una reacción específica para detectar grupos siringilo (Siegel, 1969). En el caso de *Dendroligotrichum* se observó que las ligninas, o sustancias relacionadas, se localizaban en las paredes celulares de los hidroides (células conductoras de agua). Estudios posteriores llevaron a la conclusión de que no hay ligninas en las paredes de los musgos y las sustancias encontradas podrían ser derivadas de polímeros de hidroxibenzofurano o proantocianidina. Aunque esas sustancias no son ligninas, en principio una parte de sus estructuras resulta de alguna rama de la ruta fenilpropanoide. La presencia de compuestos polifenólicos se ha confirmado tanto por análisis histoquímicos como por estudios químicos (Miksche y Yasuda, 1978; Scheirer, 1980).



Figura 11. *Dawsonia* (A), *Dendroligotrichum* (B) y *Polytrichum* (C).

Las ligninas de gimnospermas han sido intensamente estudiadas debido a su importancia comercial. Son consideradas de tipo guayacilo pero se conocen excepciones a esta norma. Mientras que *Araucaria* spp, *Ginkgo biloba*, *Taxus baccata* y *Thuja orientalis* son ejemplos de gimnospermas que inequívocamente presentan ligninas tipo G, propias de este grupo, *Ephedra viridis* presenta ligninas de tipo S, típicas de angiospermas (Fig. 12) (Gómez-Ros *et al.*, 2007a).



Figura 12. Especies de gimnospermas que presentan ligninas G: *Araucaria* spp (A), *Ginkgo biloba* (B), *Taxus baccata* (C) *Thuja orientalis* (D) y especie de gimnosperma que presenta ligninas S, *Ephedra viridis* (E).

Se asume frecuentemente que la complejidad química de las ligninas se ha incrementado durante el curso de la evolución vegetal, desde los antiguos pteridófitos y gimnospermas hasta las más modernas herbáceas (Peter y Neale, 2004); sin embargo, frecuentemente se olvida el hecho de que

traqueófitos basales tales como el licófito *S. martensii* y el helecho acuático *C. cornuta*, tienen ligninas compuestas de unidades G y S (Fig. 13) (Jin *et al.*, 2005; Gómez-Ros *et al.*, 2007a; Espiñeira *et al.*, 2011). Esta observación está en concordancia con el hecho de que licopodios y helechos acuáticos, junto con angiospermas y gnetales, tienen vasos en el xilema (Schneider y Carlquist, 2000; Carlquist y Scheider, 2000); así, la presencia de ligninas tipo S en traqueófitos basales puede estar más extendida de lo que inicialmente se pensó.



Figura 13. Géneros de traqueófitos que contienen ligninas compuestas por unidades G y S; *Selaginella* (A) y *Ceratopteris* (B).

Las plantas vasculares con esporas exhiben un rango de modelos de lignificación: el licopodio *Selaginella* posee un complejo de la pared primaria fuertemente lignificado, como el de las coníferas. El pteridófito carente de hojas *Psilotum* desarrolla una pared primaria no lignificada, mientras que *Pteridium* representa un estado intermedio con todas las capas exhibiendo una ligera lignificación (Sperry, 2003; Espiñeira *et al.*, 2011).

Selaginella se considera un punto clave en el estudio de la evolución, debido a que conserva rasgos típicos de plantas no vasculares y algunas innovaciones evolutivas, tales como los tejidos vasculares y la lignificación. A pesar de que muchas especies de plantas basales y gimnospermas sólo son capaces de sintetizar monómeros guayacilo (Gómez-Ros *et al.*, 2007a), la familia Selaginellaceae tiene capacidad para sintetizar tanto monómeros

guayacilo como siringilo, característica compartida con las angiospermas (Weng *et al.*, 2008; Banks, 2009).

II. Peroxidasas

Las peroxidasas son hemoproteínas que catalizan la oxidación monoeléctrica de diferentes sustratos a expensas del H₂O₂. Se encuentran ampliamente distribuidas en el Reino Vegetal habiéndose encontrado en euglenófitos (Shigeoka *et al.*, 1980), rodófitos (Collen *et al.*, 1994), clorófitos (Vanden Driessche *et al.*, 1984; Weger, 1997), briófitos (Matlok *et al.*, 1989), pteridófitos (Bakardjieva *et al.*, 1996) y en todos los espermatófitos estudiados (Siegel, 1993).

Tabla 1. Clasificación de peroxidasas. Modificado de Hiraga *et al.* (2001).

Clase	Miembros (nº EC)	Origen	Peso molecular (kDa)
I	Citocromo c peroxidasa (EC 1.11.1.5)	Levaduras y bacterias	32-63
	Catalasa peroxidasa (EC 1.11.1.6)	Bacterias y hongos	150-240
	Ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11)	Plantas	30-58
II	Peroxidasa dependiente de manganeso (EC 1.11.1.13)	Hongos	43-49
	Ligninasa (EC 1.11.1.14)	Hongos	40-43
III	Peroxidasa (EC 1.11.17)	Plantas	28-60

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 *et al.*, 2001). A su vez, dentro de la superfamilia de las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas se han

definido tres clases (Tabla 1) en función de las diferencias estructurales que existen entre ellas:

- Clase I: compuesta por peroxidasas bacterianas, citocromo c peroxidasa y las ascorbato peroxidasas vegetales (Eisenstadt y Bogolitsyn, 2010). No poseen naturaleza glicoproteica, están localizadas en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol y muestran una moderada especificidad de sustrato para el ácido ascórbico. En general, son consideradas como muy termolábiles.
- Clase II: agrupa a todas las peroxidasas fúngicas incluidas las lignina-peroxidasas (LiP), las manganeso-peroxidasas (MnP) y las peroxidasas fúngicas de secreción (Eisenstadt y Bogolitsyn, 2010).
- Clase III: contiene todas las peroxidasas vegetales de secreción con características distintas a otras peroxidasas vegetales. Son de naturaleza glicoproteica, estando localizadas en las vacuolas y en las paredes celulares. Muestran una baja especificidad de sustrato, con una moderada, pero notable, afinidad por el alcohol coniferílico, además de presentar una inusual estabilidad térmica (Passardi *et al.*, 2007).

II.I. Naturaleza y estructura

Las peroxidasas de clase III son glicoproteínas con un peso molecular comprendido entre 28 y 60 kDa (Hiraga *et al.*, 2001). Esta clase de peroxidasas está localizada en vacuolas y paredes celulares (Passardi *et al.*, 2005).

Están codificadas por una gran familia multigénica (Hiraga *et al.*, 2000) y además, estas enzimas muestran un alto grado de polimorfismo. Contienen como grupo prostético una molécula de protohemina IX así como dos iones estabilizadores Ca^{+2} . En su estado nativo el átomo de Fe está en estado de oxidación +3 (FeIII). 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. El sexto lugar de coordinación permanece libre, lo que determina el estado de espín del hierro (Banci, 1997). El grupo prostético es esencial para la actividad enzimática puesto que es la clave estructural para estabilizar las peroxidasas, como se ha comprobado en la peroxidasa de soja y en la de rábano (Kamal *et al.*, 2008).

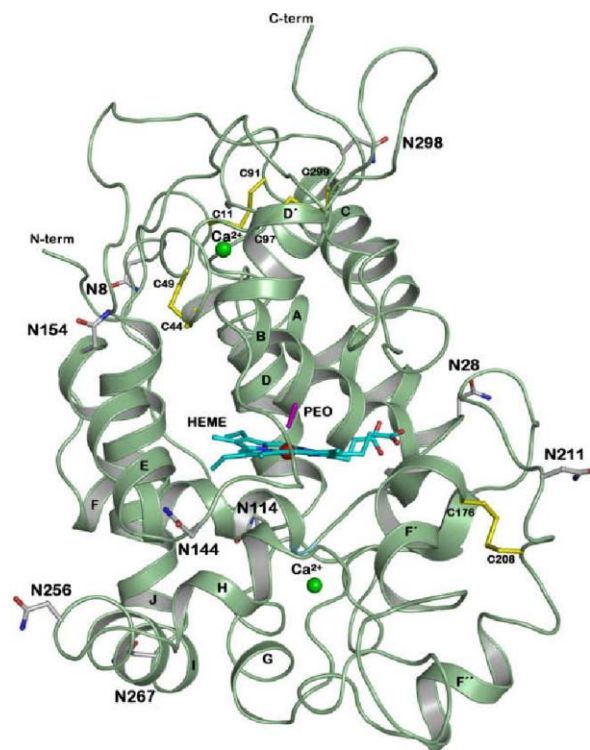


Figura 14. Estructura tridimensional de la peroxidasa de rábano picante determinada por cristalografía de rayos X. Se muestra en azul el grupo hemo en posición central entre los dominios distal y proximal. Se representa una molécula de peróxido de hidrógeno (“PEO” marcada en magenta) situada sobre el plano del grupo hemo. Los iones calcio aparecen como esferas verdes y los puentes disulfuro se indican en amarillo. Tomado de Watanabe *et al.* (2010).

Análisis cristalográficos (Watanabe *et al.*, 2010) y estudios de modelos informáticos (Ros Barceló *et al.*, 2007) revelaron que las peroxidasas vegetales de clase III normalmente contienen entre 10-12 hélices- α , 2 láminas β cortas y 4 puentes disulfuro situados sobre la base de los residuos cisteína, encargados de mantener rígida la estructura (Fig. 14).

A pesar de que estas estructuras están muy conservadas pueden producirse variaciones debidas en gran parte a la glicosilación de la enzima, que varía entre el 0 y el 25%, siendo los principales glicanos, manosa, fucosa, xilosa, N-acetilglucosamina y galactosa, aunque esta última no se encuentra en todas las peroxidasas vegetales (Gray *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; McMannus y Ashford, 1997; Wilson, 2002). La glicosilación ocurre en la superficie de los giros que conectan las hélices, de tal forma que el glicano se presenta hacia el exterior de la molécula (Veitch, 2004). La glicosilación es uno de los principales factores responsables de la gran estabilidad térmica de las peroxidasas vegetales de secreción (Ryan y Ó Fágáin, 2007). También se ha sugerido que la glicosilación está relacionada con su papel en la fisiología celular (Helenius y Aebi, 2001).

II.II. Funciones

Existe una gran dificultad para asignar una función específica a una peroxidasa en particular debido a su baja especificidad de sustrato y a la presencia de muchas isoenzimas (Hiraga *et al.*, 2001).

Las peroxidasas pueden considerarse como enzimas bifuncionales, ya que oxidan varios sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno, pero también producen especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo y oxidativo) (Passardi *et al.*, 2005).

Las peroxidasas están implicadas en muchas funciones fisiológicas, desde la germinación a la senescencia. Muchas isoenzimas se expresan de forma constitutiva, así que juegan un papel importante en la estructura y desarrollo de las plantas, mientras otras isoenzimas se inducen en respuesta a

varios estreses. Las peroxididasas participan en la oxidación de compuestos fenólicos (Fry, 2004), la defensa frente a patógenos (Lehtonen *et al.*, 2009), la elongación celular (Liszky *et al.*, 2004), el metabolismo de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (Almagro *et al.*, 2009), el metabolismo de fitohormonas (Cosio *et al.*, 2009), el entrecruzamiento de los componentes de las paredes celulares y la formación de suberina y lignina (Marjamaa *et al.*, 2009; Arrieta-Baez y Stark, 2006) (Fig. 15).

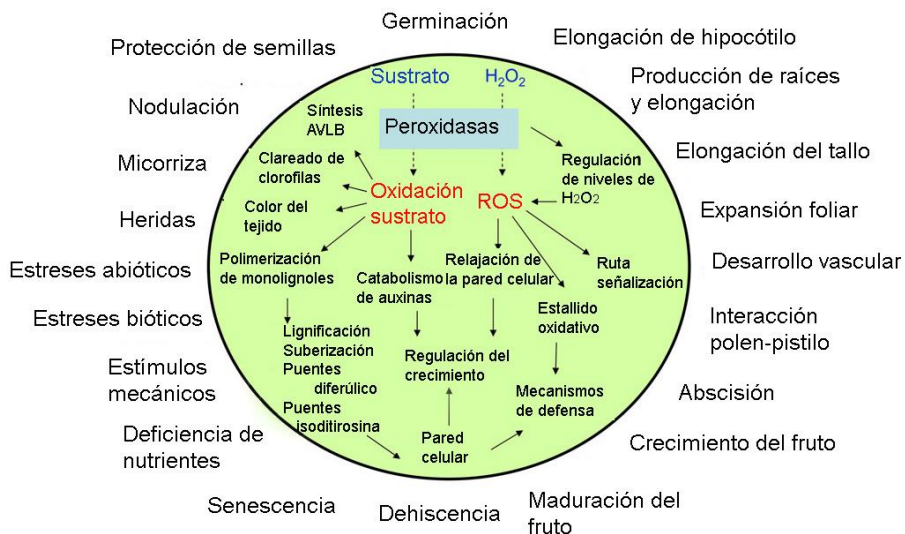


Figura 15. Esquema de las diferentes funciones fisiológicas de las peroxididasas. Modificado de Cosio y Dunand, (2009).

II.III. Polimorfismo

Las peroxididasas vegetales de secreción pueden clasificarse según su punto isoelectrónico (pI) en ácidas ($pI < 7,0$), moderadamente básicas ($7,0 < pI < 9,0$) y fuertemente básicas ($pI > 9,0$) (Quiroga *et al.*, 2000; Ros Barceló *et al.*, 2004). Estos grupos muestran una diferente localización subcelular pero una especificidad de sustrato similar. Las peroxididasas se encuentran localizadas tanto en las paredes celulares como en las vacuolas, pero mientras que el

espectro completo de peroxidasas (ácidas y básicas) se localiza en las paredes celulares, en las vacuolas sólo hay peroxidasas fuertemente básicas (Pedreño *et al.*, 1993). Esto indica que en la biosíntesis y recambio de metabolitos secundarios como los fenoles y los alcaloides, que se compartimentalizan principalmente en la vacuola, están implicadas sólo las peroxidasas básicas, mientras que en la biosíntesis de las ligninas y los entrecruzamientos de la extensina y de los grupos feruloilo de las pectinas (reacciones que tienen lugar en las paredes de la célula vegetal) están implicadas los dos tipos de peroxidasas (Pedreño *et al.*, 1993; Ros Barceló *et al.*, 1997).

Las peroxidasas vegetales de clase III están codificadas por una gran familia multigénica (Hiraga *et al.*, 2000) y muestran un alto grado de polimorfismo. En la mayoría de los casos, este polimorfismo varía con el cultivar y el órgano de la planta. En las plantas superiores se han encontrado entre 8 y 15 familias de peroxidasas, algunas de las cuales contienen dos o tres genes muy similares (Welinder, 1992).

Las isoformas pueden ser generadas por modificaciones post-traduccionales (Spoel *et al.*, 2009). Otra fuente de polimorfismo y heterogeneidad puede provenir de las modificaciones covalentes o alteraciones conformacionales, que dan una mayor estabilidad a las peroxidasas (Kranz *et al.*, 2009). Además, las alteraciones alostéricas con componentes de bajo peso molecular, como los fenoles presentes en la célula vegetal (Ros Barceló *et al.*, 1987), pueden modificar sus propiedades catalíticas (Ros Barceló y Muñoz, 1989), ampliando así su papel metabólico.

Desde la aparición de las peroxidasas de clase III el número de copias génicas se ha incrementado. Esto puede relacionarse con la adaptación de las plantas a la vida terrestre en la presencia de elevadas concentraciones de oxígeno, lo cual causa un estrés en la propia planta. La evolución de una familia multigénica parece estar relacionada con el aumento de la complejidad de las plantas y con la diversificación de sus biotopos y patógenos (Passardi *et al.*, 2004).

En *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado la duplicación que ha llevado a la producción de grandes familias multigénicas. En *O. sativa* se han identificado 138 genes (Passardi *et al.*, 2004) y en *A. thaliana* se encuentran 73 genes que codifican diferentes peroxidasas (Tognolli *et al.*, 2002). Al estudiar las respuestas a varios estreses en estas plantas se ha podido identificar que las diversas isoformas de peroxidasas poseen distintas funciones (Hiraga *et al.*, 2000; Welinder *et al.*, 2002; Cosio y Dunand, 2009).

Todas estas características implican que una completa comprensión del papel de las peroxidasas sólo puede lograrse a través de un análisis detallado de la expresión espacial y temporal de cada isoenzima de peroxidasa, así como su especificidad de sustrato (Christensen *et al.*, 2001).

II.IV. Localización tisular y subcelular

Probablemente para compensar la amplia gama de sustratos que son capaces de emplear, las peroxidasas presentan una compartimentalización tisular muy específica. Así, están localizadas en los tejidos meristemáticos (Crevecoeur *et al.*, 1997), en las células epidérmicas (Goldberg *et al.*, 1987; Hendriks y van Loon, 1990; Ferrer y Ros Barceló, 1994a) y en las vasculares (Czaninski y Catesson, 1969; Ros Barceló *et al.*, 2002). En las células vasculares, las peroxidasas pueden estar localizadas en el xilema (Ferrer y Ros Barceló, 1994b) y, secundariamente, en las células del cambium y del floema. En los frutos, las peroxidasas están fundamentalmente localizadas en las células epidérmicas y del xilema (Calderón *et al.*, 1993) y en las hojas también están compartimentalizadas en las células del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló, 1997). En todos estos tejidos, las peroxidasas se encuentran localizadas tanto en las paredes celulares como en las vacuolas, sin embargo, en las células meristemáticas (Crevecoeur *et al.*, 1997), cambiales (Ros Barceló *et al.*, 1991) y del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló, 1997), las peroxidasas están principalmente localizadas en la vacuola, bien en forma soluble (Crevecoeur *et al.*, 1997) o firmemente ligadas a la cara interna del tonoplasto (Ros Barceló *et al.*, 1991; Sottomayor y Ros Barceló, 1997). Esta

situación es ligeramente diferente en las células epidérmicas y del xilema, donde las peroxidasas están localizadas principalmente en las paredes celulares, tanto en las primarias (Goldberg *et al.*, 1987), fundamentalmente a nivel de las esquinas celulares y de la lámina media, como en los engrosamientos secundarios (Ros Barceló, 1995; Ros Barceló *et al.*, 2002), siendo las pectinas uno de los factores que contribuyen a la distribución específica de las distintas isoenzimas de las peroxidasas en los diferentes dominios de la pared celular (Ros Barceló *et al.*, 1988).

II.V. Papel fisiológico en la lignificación

Un 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 peroxidasas, esta correlación ha sido frecuentemente descrita en el endocarpo de melocotón (Abeles y Biles, 1991), en fibras de lino (McDougall, 1992), en el álamo (Baier *et al.*, 1993), en agujas de picea noruega (Polle *et al.*, 1994) y en células en suspensión de *Zinnia elegans* durante la diferenciación en traqueidas (Sato *et al.*, 1995). 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, lo que podría 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. El papel que desempeñan las peroxidasas en la polimerización de los alcoholes cinamílicos ha sido ampliamente descrito, de modo que en tejidos lignificantes de tabaco (Lagrimini *et al.*, 1987), de tomate (Mohan *et al.*, 1993) y de álamo (Osakabe *et al.*, 1994) se acumulan tanto los promotores del gen de la peroxidasa como se produce una expresión de sus transcritos.

Estudios posteriores de sobreexpresión y supresión de peroxidasas han puesto de manifiesto el papel que desarrollan en la lignificación. En tomate

la sobreexpresión de una peroxidasa básica produjo un aumento del contenido de lignina (El-Mansouri *et al.*, 1999), mientras que en el tabaco el silenciamiento parcial de una peroxidasa de carácter también básico causó una reducción tanto de unidades S como de unidades G (Talas-Ogras *et al.*, 2001; Blee *et al.*, 2003). Por el contrario, el silenciamiento parcial de una isoenzima ácida de la misma especie no produjo una disminución significativa en la lignificación (Lagrimini *et al.*, 1997). Por otra parte, en el álamo el silenciamiento parcial de una peroxidasa ácida dio como resultado la reducción de hasta un 20% del contenido de ligninas, que en este caso sólo produjo una reducción de unidades G (Li *et al.*, 2003). Así, aunque se ha descrito que la peroxidasa responsable de la lignificación es de carácter básico (Gabaldón *et al.*, 2005) algunas peroxidasas de carácter ácido participan también en la lignificación tal y como describen Li *et al.* (2003), de modo que la diferencia entre las peroxidasas ácidas y básicas puede ser la participación diferencial en la formación de ligninas.

A pesar de que tanto las peroxidasas ácidas como las básicas son capaces de oxidar los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, este hecho no está tan claro en el caso del alcohol sinapílico, que no es sustrato de muchas peroxidasas ácidas, que con algunas excepciones son consideradas como pobres catalizadores (Christensen *et al.*, 1998; Bernards *et al.*, 1999). Esta observación es importante para revelar la especificidad y naturaleza de la enzima implicada en la biosíntesis de lignina, puesto que el alcohol sinapílico es más proclive a la oxidación que los alcoholes coniferílico y *p*-cumarílico (Kobayashi *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que, aunque las reacciones catalizadas por las peroxidasas están conducidas por fuerzas redox (Ros Barceló *et al.*, 2004), la acomodación del sustrato en el centro catalítico de la enzima determina el papel real que juega cada peroxidasa en la biosíntesis de ligninas (Kobayashi *et al.*, 2005; Ros Barceló *et al.*, 2007). Así, se ha determinado por estudios de cristalografía de rayos X que la oxidación del alcohol sinapílico por ciertas peroxidasas ácidas está dificultada estéricamente debido a interacciones hidrofóbicas desfavorables entre los átomos metoxi del alcohol sinapílico y los residuos conservados I-138 y P-139 en el sitio de unión al sustrato de la enzima (Østergaard *et al.*, 2000). Este solapamiento

aparentemente no ocurre en el sitio de unión al sustrato de las peroxidasas ácidas que oxidan a la siringaldazina (Christensen *et al.*, 2001), y por supuesto, tampoco ocurre en la mayoría de las peroxidasas básicas, donde el residuo I-138 está sustituido por el residuo L-138. La capacidad de estas enzimas para oxidar residuos siringilo está universalmente aceptada (Tsutsumi *et al.*, 1994; Bernards *et al.*, 1999; Quiroga *et al.*, 2000; Ros Barceló *et al.*, 2000; Ros Barceló y Pomar, 2001; Aoyama *et al.*, 2002), lo cual explicaría por qué la supresión antisentido de las peroxidasas básicas en plantas transgénicas disminuye tanto los niveles de unidades G como de S (Blee *et al.*, 2003), mientras que la supresión antisentido de ciertas peroxidasas ácidas sólo produce la disminución de los niveles de unidades G (Li *et al.*, 2003).

Ros Barceló *et al.* (2007) identificaron los determinantes estructurales diferenciales de las peroxidasas de tipo siringilo, alineando la secuencia aminoacídica de peroxidasas capaces de oxidar los residuos siringilo y de dos peroxidasas guayacilo típicas. Estos motivos estructurales son necesarios y suficientes para determinar la actividad siringil-oxidasa de las peroxidasas, como lo demuestra el hecho de que la peroxidasa PAPX5 de *Picea abies*, que es capaz de oxidar la siringaldazina (Marjamaa *et al.*, 2006), muestra todos los motivos estructurales comunes a estas peroxidasas.

Para determinar la función de las peroxidasas es necesario conocer los sustratos que oxidan, lo que nos da información acerca de la función que desempeñan en el organismo, ya que una peroxidasa implicada en la lignificación debería tener la capacidad de oxidar a los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos. Cuando se estudian las afinidades de varias peroxidasas 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, 1998a), los cuales son menores que los mostrados por las lacasas vegetales (12 mM) (Bao *et al.*, 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 *et al.*, 1995). En este punto, no se debe olvidar que los valores de K_M de las peroxidasas con respecto a los sustratos 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 peroxidasa, cuando se usan concentraciones de alcohol coniferílico entre 30 y 160 μM , sugieren que dichas enzimas se encuentran muy bien adaptadas a trabajar en presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 (Takahama, 1993; Ros Barceló, 1998a).

Debido a la necesidad de H_2O_2 que tienen estas enzimas para su actuación, es lógico pensar que para que las peroxidasa tengan un papel activo en la lignificación de la pared celular, no sólo sea indispensable que éstas se encuentren localizadas en las mismas áreas de la pared que lignifica, sino que también, en ellas, las peroxidasa permanezcan activas. Por ello, es conveniente, aunque no indispensable (Ferrer *et al.*, 1990), que dichas áreas de la pared celular muestren producción de H_2O_2 con el fin de favorecer la actividad de las peroxidasa. En este sentido, se ha de mencionar el trabajo de Nose *et al.* (1995), donde se ha descrito que agentes secuestradores del H_2O_2 inhiben la lignificación de suspensiones celulares de *Pinus taeda*, datos que refuerzan la idea de que la síntesis de ligninas es totalmente dependiente de la producción de H_2O_2 , pudiendo tener éste, en cierta medida, un papel regulador. El mayor dilema que persiste hoy en día se refiere al mecanismo a través del cual se genera el H_2O_2 necesario para activar a las peroxidasa durante la oxidación de los alcoholes cinamílicos. Diferentes estudios parecen apuntar la idea de que dicho sistema generador de H_2O_2 estaría localizado a nivel de la membrana plasmática e implicaría a una NAD(P)H oxidasa que usaría NADPH citoplasmático (Ros Barceló, 1998b; Ogawa *et al.*, 1997), o también las oxalato oxidasa que se encontrarían en el apoplasto (Bolwell y Wojtaszek, 1997).

II.VI. Evolución de peroxidasa siringilo

En los últimos años se han estudiado las paredes celulares y las ligninas de diversas especies vegetales, como las algas, los briófitos y los pteridófitos en relación a la presencia de ligninas S, las cuales se forman en

una reacción de oxidación mediada por las peroxidasas siringilo (Ralph *et al.*, 2004; Ros Barceló *et al.*, 2007).

Las peroxidasas de tipo siringilo muestran una amplia distribución en las angiospermas y son capaces de oxidar los alcoholes involucrados en la biosíntesis específica de ligninas siringilo, lo que parece indicar que no tienen restricciones estéricas durante la catálisis (Gómez-Ros *et al.*, 2007b). El análisis de varias secuencias de peroxidasas siringilo sugiere que éstas constituyen una rama ancestral, cuyos orígenes se remontan a linajes de plantas no vasculares de origen monofilético (Gómez-Ros *et al.*, 2007a, b). Además se ha descrito la presencia de peroxidasas capaces de oxidar el alcohol sinapílico en especies basales que no lignifican, como las algas *Ulva rigida* y *Cystoseira baccata* y el musgo *P. patens* (Espíñeira *et al.*, 2011). Todo esto indica que las peroxidasas S aparecieron de manera temprana en la evolución de las plantas y que estas enzimas han sido altamente conservadas durante la evolución de las angiospermas.

La peroxidasa de tipo siringilo mejor caracterizada es la peroxidasa básica de *Z. elegans*, que se ha purificado y clonado (Gabaldón *et al.*, 2005). Esta peroxidasa está implicada en la lignificación de esta especie y presenta valores de K_M bajos frente a los precursores de los monómeros de ligninas; el alcohol *p*-cumarílico con una K_M de 241 μM , el alcohol coniferílico para el que presenta una K_M de 83 μM y el alcohol sinapílico con una K_M de 15 μM . Además, los valores más altos de eficacia catalítica se alcanzan en la oxidación del alcohol sinapílico ($25,46 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) siendo de $0,15 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para el *p*-cumarílico y de $1,20 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para el alcohol coniferílico. Los estudios realizados por Gabaldón *et al.* (2005) han permitido caracterizar esta enzima y usarla como modelo de las peroxidasas de tipo siringilo. Debido a que esta peroxidasa se utilizó como modelo de las peroxidasas siringilo se desarrolló un método rápido para la detección de peroxidasas homólogas a la de *Z. elegans* mediante análisis con IEF. Esta metodología permitió localizar la presencia en otras especies tanto de peroxidasas análogas como homólogas a la de *Z. elegans* en base a las propiedades moleculares de las mismas, tales como el pI (Gómez-Ros *et al.*, 2007b).

Gómez-Ros *et al.* (2007a) identificaron los motivos estructurales de peroxidasas S mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de un conjunto de peroxidasas cuya capacidad para oxidar grupos S era bien conocida con dos peroxidasas G típicas. Mediante esta comparación se comprobó la presencia de determinantes típicos de peroxidasas siringilo. Este tipo de peroxidasas están conservadas no sólo en las angiospermas, sino también en gnetales (que contienen ligninas G y S); en coniferales, tales como *Pinus sylvestris* (que carece de ligninas S); en gimnospermas basales (Cycadales y Ginkgoales que contienen ligninas G y S); en los helechos *S. moellendorffii* y *C. cornuta* (que contienen tanto ligninas G como S) y en las plantas no vasculares *M. polymorpha* (que contiene ligninas S) y *P. patens* (que no contiene ligninas) (Logan y Thomas, 1985; Gómez Ros *et al.*, 2007a; Ros Barceló *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de peroxidasas siringilo no es tan excepcional como se suponía anteriormente, y su presencia no sólo es anterior a la divergencia de gimnospermas y angiospermas sino también a la radiación de los traqueófitos. Esta observación sugiere que los genes que codifican estas enzimas son anteriores a la aparición de las plantas vasculares (Gómez Ros *et al.*, 2007a; Duroux y Welinder, 2003), e incluso podría ser contemporánea a la adquisición del sistema más primitivo de transporte de nutrientes que ha coevolucionado en musgos y hepáticas (Ligrone *et al.*, 2000). Así, según estos datos, las peroxidasas de tipo guayacilo constituyen el estado más evolucionado de las peroxidasas vegetales (Peter y Neale, 2004).

Comparando la estructura tridimensional de una peroxidasa de tipo siringilo (*Z. elegans*) y otra de tipo guayacilo (ATP A2 de *A. thaliana*), se ponen de manifiesto las diferencias que hay entre ellas, lo que podría explicar la diferente especificidad de sustrato (Fig. 16). En las peroxidasas de tipo siringilo está ausente la hélice D' (Gómez Ros *et al.*, 2007a), que en la ATP A2 fija la posición del grupo prostético (Østergaard *et al.*, 2000). Esto supondría un factor de relajación del centro catalítico en las peroxidasas siringilo, permitiendo así el acceso a grupos tipo siringilo. Además, la hélice D' fija el motivo IPS en la ATP A2, que determina la conformación y la hidrofobicidad del sitio de unión al sustrato (Østergaard *et al.*, 2000). Otra diferencia entre las

peroxidasa de tipo siringilo y la guayacilo es la disposición de láminas β . En la ATP A2 aparece una lámina β , sin embargo en las peroxidasa siringilo aparecen nuevas láminas β (Gómez Ros *et al.*, 2007a) adyacentes a la histidina proximal, por lo que deben influir en la conformación del centro catalítico. Todos estos factores probablemente condicionan la especificidad de sustrato de estas enzimas, determinando propiedades catalíticas únicas (Ros Barceló *et al.*, 2007).

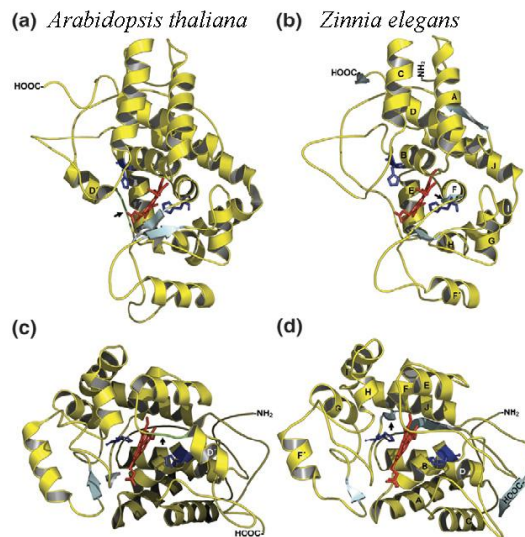


Figura 16. Estructura tridimensional de la ATP A2 de *A. thaliana* (a y c) y de *Z. elegans* (b y d). Se distinguen el grupo hemo (rojo), las histidinas proximal y distal (azul claro), las hélices α (amarillo), la hélice D' en *A. thaliana* (verde), la lámina β típica de las ligninas de tipo guayacilo en *A. thaliana* (azul) y la nueva lámina β de las peroxidasa siringilo en *Z. elegans* aguas arriba de la histidina proximal (flechas). Tomada de Ros Barceló *et al.* (2007).

Debido a que la característica principal de las peroxidasa siringilo es la ausencia de restricciones estéricas en el sitio de unión del sustrato, estas observaciones apoyan la existencia de un modelo ancestral básico de la arquitectura de la pared celular, cuya función ha evolucionado antes de la divergencia evolutiva de briófitos, helechos y plantas con semillas (Gómez Ros *et al.*, 2007a; Ligrone *et al.*, 2002). Hasta muy recientemente, la mayoría de las

peroxidasas de plantas con flores mejor caracterizadas podían oxidar únicamente al alcohol coniferílico (Østergaard *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2001), y esto provocaba la creencia general de que las angiospermas eran ineficientes para la oxidación del alcohol sinapílico (Østergaard *et al.*, 2000). Sin embargo, se han publicado trabajos recientes de caracterización molecular y clonación de peroxidasas capaces de oxidar alcohol sinapílico en angiospermas (Gabaldón *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2006).

En esta tesis, se muestra que las plantas basales seleccionadas, *M. polymorpha*, *P. patens* y *S. martensii* presentan peroxidasas de tipo siringilo. Además, una caracterización de la función de estas peroxidasas pone de manifiesto su comportamiento bajo diversos factores tales como el pH, el uso de diferentes sustratos o la cantidad de sustrato.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- I. Purificación en *M. polymorpha*, *P. patens* y *S. martensii* de peroxidasas básicas análogas a la peroxidasa responsable de la lignificación de *Z. elegans*.
- II. Caracterización bioquímica, cinética y proteómica de las peroxidasas purificadas.
- III. Estudio del efecto de diversos tipos de estrés en la actividad y la expresión proteica de peroxidasas en *P. patens*.
- IV. Estudio del secretoma radicular de *P. patens* durante su desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Material vegetal

I.1. *Marchantia polymorpha* (L.)

M. polymorpha es una especie de la división Marchantiophyta y del orden de las Marchantiales, que presenta color verde oscuro en los talos en crecimiento, aunque en los talos de más edad se sustituye por un color rojizo. Crece en turberas, prados húmedos, bordes de arroyos y en zonas con elevada humedad de hábitats tropicales. Esta especie posee un talo ramificado dicotómicamente con crecimiento apical. En la parte ventral contiene dos tipos de rizoides, los lisos que penetran en el suelo y los tuberculados, que forman cordones. Su ciclo reproductivo es dioico presentando una fase asexual en la cual la planta se reproduce mediante propágulos y una fase sexual en los que los anteridios y los arquegonios producen gametos tanto femeninos como masculinos (Fig. 17).

M. polymorpha fue proporcionada por el vivero Borrazás de Bergondo (A Coruña).

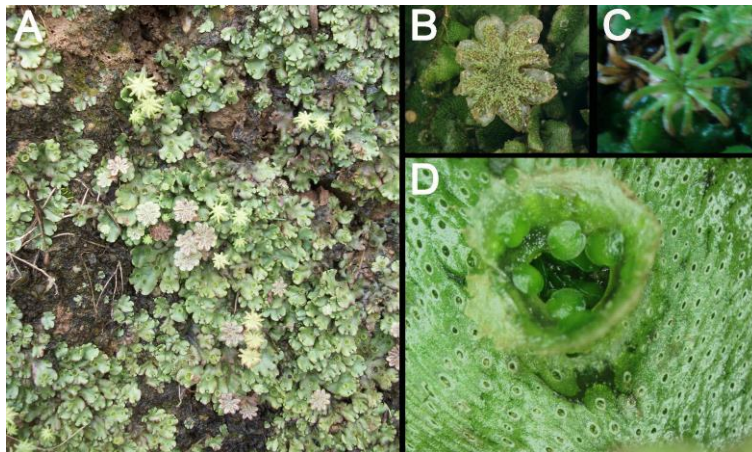


Figura 17. *M. polymorpha*: talo en crecimiento (A), arquegonio masculino (B), arquegonio femenino (C) y propágulos en su conceptáculo (D).

I.II. *Physcomitrella patens* ([Hedw.] Bruch & Schimp.)

P. patens es un musgo usado como organismo modelo en estudios de evolución vegetal, desarrollo y fisiología (Cove *et al.*, 2006; Reski y Frank, 2005), y cuyo genoma está completamente secuenciado (Rensing *et al.*, 2004). Muestra un sistema conductor de agua interno que contiene hidroides y células vivas con paredes engrosadas (estereidas) que, no obstante, no lignifican (Ligrone *et al.*, 2000).



Figura 18. *P. patens*: gametófitos (A), rizoides (B) y esporófito (C).

Esta especie de la división Bryophyta y orden de las *Funariales* posee filamentos de protonemas cuyas células apicales tienen un crecimiento exclusivamente apical y pueden originar ramas laterales de células subapicales (Fig. 18). Algunas células laterales pueden diferenciarse en brotes más que en ramas laterales, y estos brotes pueden alcanzar a ser gametóforos, que son estructuras más complejas, asimilándose a estructuras semejantes a hojas, rizoides y hasta a órganos sexuales: femenino (arquegonio) y masculino (anteridio).

El ciclo de vida de *P. patens* se caracteriza por la alternancia de dos generaciones, la fase haploide en la cual el gametófito produce gametos y la

fase diploide donde el esporófito produce esporas haploides. Los órganos sexuales (anteridios y arquegonios) se forman en los gametangios que emergen del gametófito. Ambos órganos sexuales se pueden encontrar en un solo gametófito indicando que *P. patens* es monoica.

Tabla 2. Composición del medio utilizado para el cultivo de *P. patens*.

Constituyente	g l⁻¹
Macronutrientes	
CaNO ₃ x 4 H ₂ O	1
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25
NH ₄ -Tartrato	0,5
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	0,000614
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,000389
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,000055
KI	0,000028
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,000025
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,000055
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,000055
Fuente de hierro	
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	0,01673
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0125
Vitaminas	
Ácido Nicotínico	0,001
Tiamina / HCl	0,0005
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	0,00025
Fuente de carbono	
Glucosa	5
Tamponador de pH	
Tampón fosfato	0,1 mM
Agar	7
pH 5,8	

P. patens fue proporcionada por el Dr. Alonso Rodríguez Navarro, del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, manteniéndose en condiciones estériles como describen Benito y Rodríguez-Navarro (2003).

La composición del medio de cultivo se muestra en la tabla 2. Las plantas fueron micropropagadas cada 28 días y se mantuvieron en una cámara de cultivo a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Así mismo se hicieron cultivos líquidos de *P. patens* con el medio descrito en la tabla 2, sin agar, en matraces que contenían 100 ml de medio y 3 gramos de material vegetal. Estos matraces se mantuvieron en una cámara de cultivo en las condiciones descritas anteriormente y con una agitación de 130 rpm para garantizar un aporte equitativo de los nutrientes y del oxígeno a todas las plantas en suspensión.

I.III. *Selaginella martensii* (Spring)

S. martensii (Fig. 19) es una especie que pertenece a la división Lycophyta, del orden Selaginellales, cuyos miembros se caracterizan por ser plantas acuáticas o palustres, con macrófilos en roseta, esporófilos no agrupados en estróbilos, esporangios pluriloculares y anterozoides pluriciliados.

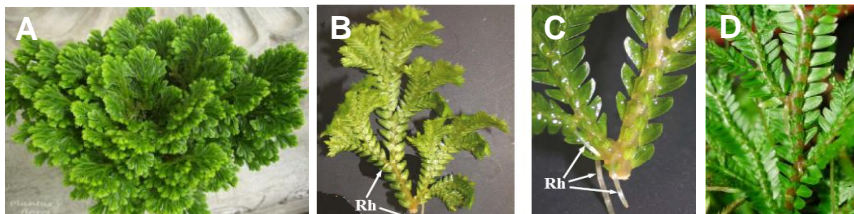


Figura 19. *S. martensii*: imagen apical de la fronde (A), vista de los rizóforos en el tallo (B, C) y detalle de la característica anisófila de la fronde (D). En el tallo se puede observar el crecimiento de raíces aéreas (Rh).

Es de color verde brillante y sus tallos y frondes están ramificados desde la base. Además, los rizóforos son gruesos, largos y rectos. Es una especie que se utiliza mucho de forma ornamental, por lo que se puede encontrar con bastante facilidad en las tiendas a pesar de tratarse de una especie de hábitats tropicales.

Los licófitos constituyen un grupo monofilético de plantas que datan del Devónico temprano y que constan de tres familias, Lycopodiaceae, Isoetaceae y Selaginellaceae. Esta última consta además de una sola familia, Selaginellaceae, con un solo género, *Selaginella*. Se seleccionó esta familia y a su vez a *S. martensii* ya que contiene tanto características ancestrales como modernas (Banks, 2009). Además, uno de los miembros de *Selaginella*, *S. moellendorffii*, ha sido secuenciado totalmente, lo cual hace más fácil el estudio de este género (Banks *et al.*, 2011). *S. martensii* fue adquirida en la Floristería Muguet de A Coruña, en maceta y sobre humus.

II. Localización histoquímica de peroxidasas y ligninas

Las tinciones histoquímicas se realizaron sobre secciones de un grosor comprendido entre 100 y 300 μm . Para cada especie se utilizaron diferentes partes de la planta, utilizándose para *M. polymorpha* los talos, para *P. patens* los gametófitos y para *S. martensii* las frondes (Fig. 20).

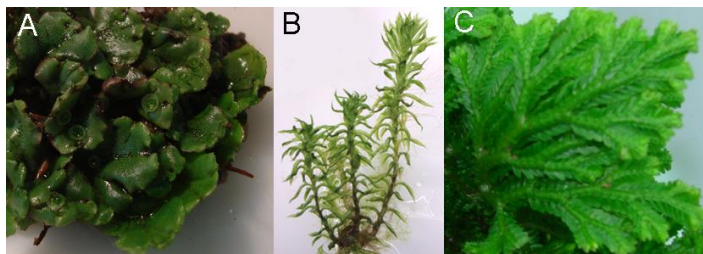


Figura 20. Talo de *M. polymorpha* (A), gametófitos de *P. patens* (B) y fronde de *S. martensii* (C).

Las observaciones y fotografías se realizaron con un microscopio estereoscópico SMZ 150 dotado de una cámara digital Nikon DXM1200.

Tinción con tetrametilbenzidina

Para la localización de la actividad peroxidasa se incubaron durante 20 minutos a 25°C secciones de las plantas en tampón Na-acetato 50 mM pH 5,0 que contenía 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en una concentración de 0,1 mg ml⁻¹.

Tinción de Wiesner

Esta tinción es específica para los grupos cinamaldehído presentes en las ligninas (Pomar *et al.*, 2002). Las secciones histológicas se tiñeron con una disolución que contenía floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) al 1% (p/v) en HCl/EtOH (25:75) (v/v) durante 10-15 minutos, periodo tras el cual se observaron los cortes en campo claro.

Tinción de Mäule

Además de la tinción de Wiesner se empleó el test de Mäule, una reacción específica para grupos siringilo presentes en las ligninas. Las secciones se incubaron en KMnO₄ al 1% durante 5 minutos. A continuación se realizó un lavado con ácido clorhídrico al 30%, y finalmente se observaron en amoníaco al 100% (Pomar *et al.*, 2002).

III. Extracción de proteínas totales

Para obtener la proteína total se usaron talos de *M. polymorpha*, gametófitos en el caso de *P. patens* y frondes de *S. martensii*. El material fue homogeneizado en una batidora usando un tampón Tris-HCl 50 mM EDTA 1 mM y KCl 1 M pH 7,5 en una proporción 1:2 (p/v). En el momento de la homogeneización se le añadió al tampón 0,05 g de PVPP por gramo de peso fresco. Todo el proceso se realizó a 4°C.

El homogeneizado se filtró a través de dos gasas, previamente enfriadas, se descartó el material retenido y el filtrado se centrifugó durante 40 minutos a 15000g en una centrífuga refrigerada Eppendorf. Tras este tiempo se recogió el sobrenadante y se descartó el precipitado. Por último, la fracción obtenida se dializó durante toda la noche en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

IV. Purificación de peroxidasas

IV.I. Precipitación con sulfato amónico

La obtención de las proteínas de cada una de las muestras se realizó mediante una precipitación fraccionada con sulfato amónico. El método de precipitación fraccionada tiene como base la diferente solubilidad que presentan las proteínas en función de la concentración de sales. Así, una alícuota de la fracción proteica extraída se precipitó con diferentes porcentajes de sulfato amónico que, en el caso de *M. polymorpha* fueron: 50, 65 y 95%, mientras que para *P. patens* y *S. martensii* se emplearon 25, 40, 50, 65, 80 y 95%.

Se comenzó precipitando el material con la concentración más baja de sulfato amónico durante una hora y media a 4°C y se centrifugó a 27000g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado se conservó, mientras que el sobrenadante de esta primera centrifugación se utilizó para precipitar el material con una concentración superior de sulfato amónico, en las condiciones descritas anteriormente, realizándose de manera análoga los siguientes pasos de precipitación. Cada precipitado se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y se dializó toda la noche frente al mismo tampón. Los patrones de proteínas totales e isoenzimas de peroxidasa presentes en cada fracción precipitada se siguieron mediante el desarrollo de SDS-PAGE e isoelectroenfoque, respectivamente.

En función de estos patrones, se decidió realizar para cada especie diferentes precipitaciones con la totalidad del material vegetal extraído. Para

M. polymorpha se realizó una precipitación con sulfato amónico del 0 al 65% y del 65 al 95%, tal y como se describe anteriormente, mientras que *P. patens* se decidió precipitar toda la proteína al 95%. En el caso de *S. martensii* se decidió realizar con la totalidad del material vegetal extraído una precipitación con sulfato amónico del 0 al 80% y otra del 80 al 95%.

Tras dializar la muestra se procedió a concentrarla empleando filtros de membrana Amicon Ultra-15 siguiendo las indicaciones del fabricante (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda).

Para la purificación posterior de las fracciones obtenidas se utilizó el sistema cromatográfico Äkta de GE Healthcare.

IV.II. Purificación parcial de peroxidasas de *M. polymorpha*

IV.II.I. Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow

Este tipo de cromatografía está basado en la hidrofobicidad diferencial que muestran las proteínas bajo ciertas condiciones del medio que las rodea. Entre estas condiciones, la que más se utiliza para facilitar la exposición de las zonas hidrofóbicas internas es el sulfato amónico a concentraciones que suelen oscilar entre 1-2,5 M.

La matriz más empleada para fijar las proteínas por hidrofobicidad es la Fenil-Sefarosa, gel que parece eliminar una gran cantidad del material que absorbe a 280 nm y, además, posee una alta capacidad para retener proteínas, resultando un método idóneo como paso inicial en la purificación de peroxidasas. Con este propósito, se realizó esta primera cromatografía partiendo de una concentración de sulfato amónico de 1,5 M disminuyéndose esta concentración con un gradiente lineal.

La columna de Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow (Volumen total, $V_T = 55$ ml) fue empaquetada y equilibrada con sulfato amónico 1,5 M en Tris-HCl 50

mM pH 7,5. La muestra procedente de la extracción del material vegetal, ya preparada con una concentración de 1,5 M de sulfato amónico, se aplicó sobre el gel. Tras aplicar la muestra de proteína, la cromatografía se realizó con el siguiente gradiente decreciente de sulfato amónico: i) 100% de tampón A, minutos 0-130, ii) 0-100% de tampón B, minutos 130-330; y iii) 100% de tampón B, minutos 330-480; utilizándose como tampón A sulfato amónico 1,5 M en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, y como tampón B, Tris-HCl 50 mM pH 7,5. La cromatografía se realizó a un flujo de 1 ml min⁻¹ recogiendo fracciones de 5 ml.

IV.II.II. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP-Sefarosa™ Fast Flow

El intercambio iónico es uno de los métodos que se incluyen en la gran mayoría de los esquemas de purificación de enzimas. Debido a que se basa en la carga neta que presentan las enzimas a un pH dado, existen intercambiadores aniónicos (cargados positivamente), entre los que destacan aquellos que contienen grupos amonio, e intercambiadores catiónicos (cargados negativamente), entre los que destacan los que contienen grupos carboxilato o sulfopropilo. Dado el elevado punto isoeléctrico de las peroxidasas de *M. polymorpha*, se escogió un intercambiador con grupos sulfopropilo por presentar carga neta negativa en un amplio rango de pH, donde la peroxidasa presenta carga neta positiva.

La columna de SP-Sefarosa™ Fast Flow ($V_T = 30$ ml) fue empaquetada y equilibrada con tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,2. La muestra procedente de la cromatografía hidrofóbica se concentró y simultáneamente se dializó frente a un tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,2, usando el sistema de filtros de membrana Amicon Ultra-15. Tras aplicar la muestra, la cromatografía se realizó con un programa que incluyó un gradiente ascendente de cloruro potásico. Este gradiente consistía en: i) 0% de tampón B, minuto 0-104; ii) 0-100% de tampón B, minuto 104-204; y iii) 100% de tampón B, minuto 204-325; siendo el tampón A Tris-HCl 25 mM pH 8,2, y el tampón B, Tris-HCl 25 mM pH 8,2 con KCl 0,5

M. La cromatografía se llevó a cabo a un flujo de 1 ml min^{-1} recogiendo fracciones de 1 ml.

IV.III. Purificación de peroxidasas de *P. patens*

IV.III.I. Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow

La cromatografía sobre Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow ($V_T = 55 \text{ ml}$) se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas en el apartado IV.I.II con el siguiente gradiente decreciente de sulfato amónico: i) 100% de tampón A, minutos 0-160, ii) 0-100% de tampón B, minutos 160-360; y iii) 100% de tampón B, minutos 360-500; utilizando como tampón A sulfato amónico 1,5 M en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, y como tampón B, Tris-HCl 50 mM pH 7,5. La cromatografía se realizó a un flujo de 1 ml min^{-1} recogiendo fracciones de 5 ml.

IV.III.II. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP-Sefarosa™ Fast Flow

Para esta segunda cromatografía se escogió un intercambiador catiónico con grupos sulfopropilo por presentar carga neta negativa en un amplio rango de pH, donde la peroxidasa presenta carga neta positiva.

La columna de SP-Sefarosa™ Fast Flow ($V_T = 30 \text{ ml}$) fue empaquetada y equilibrada con tampón ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propano-sulfónico (CAPS) 50 mM pH 9,5. La muestra procedente de la cromatografía hidrofóbica se concentró y simultáneamente se dializó frente a un tampón CAPS 50 mM pH 9,5, usando el sistema de filtros de membrana Amicon Ultra-15.

Tras aplicar la muestra, la cromatografía se realizó con un programa que incluyó un gradiente ascendente de pH efectuado con dos tampones. Este

gradiente consistía en: i) 0% de tampón B, minuto 0-70; ii) 0-100% de tampón B, minuto 70-170; y iii) 100% de tampón B, minuto 170-200; siendo el tampón A CAPS 50 mM pH 9,5, y el tampón B, CAPS 50 mM pH 11,5. La cromatografía se llevó a cabo a un flujo de 1 ml min⁻¹ recogiéndose fracciones de 1 ml.

IV.IV. Purificación de peroxidasas de *S. martensii*

IV.IV.I. Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-SefarosaTM 6 Fast Flow

La cromatografía sobre Fenil-SefarosaTM 6 Fast Flow ($V_T= 55$ ml) se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas en el apartado IV.I.II con el siguiente gradiente decreciente de sulfato amónico: i) 100% de tampón A, minutos 0-130, ii) 0-100% de tampón B, minutos 130-330; y iii) 100% de tampón B, minutos 330-500; utilizando como tampón A sulfato amónico 1,5 M en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, y como tampón B, Tris-HCl 50 mM pH 7,5. La cromatografía se realizó a un flujo de 1 ml min⁻¹ recogiéndose fracciones de 5 ml.

IV.IV.II. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP-SefarosaTM Fast Flow

La cromatografía sobre SP-SefarosaTM Fast Flow ($V_T= 30$ ml) se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas en el apartado IV.I.III para las enzimas SmaPrx1 y SmaPrx3 con el siguiente gradiente: i) 100% de tampón A, minuto 0-50; ii) 0-100% de tampón B, minuto 50-150; y iii) 100% de tampón B, minuto 150-310; siendo el tampón A CAPS 50 mM pH 9,5, y el tampón B, CAPS 50 mM pH 11,5. La cromatografía se llevó a cabo a un flujo de 1 ml min⁻¹ recogiéndose fracciones de 1 ml.

Para la muestra SmaPrx2 la columna fue equilibrada con tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,2. Tras aplicar la muestra, la cromatografía se realizó con un programa que incluyó un gradiente ascendente de cloruro potásico. Este gradiente consistía en: i) 100% de tampón A, minuto 0-50; ii) 0-100% de tampón B, minuto 50-200; y iii) 100% de tampón B, minuto 200-275; siendo el tampón A Tris-HCl 25 mM pH 8,2, y el tampón B, Tris-HCl 25 mM pH 8,2 con KCl 1 M. La cromatografía se llevó a cabo a un flujo de 1 ml min⁻¹ recogiendo fracciones de 1 ml.

V. Determinación de la actividad peroxidasa

El método usado para la determinación de la actividad peroxidasa se basa en la estimación espectrofotométrica directa de la variación de la absorbancia que se produce al catalizar la enzima la transformación de un sustrato.

La actividad peroxidasa de las distintas muestras se determinó a 25°C en un espectrofotómetro Heλios y de Thermo, usando un medio de reacción que contenía tampón Na-acetato 50 mM pH 5,0, H₂O₂ 0,5 mM, y distintos donadores de electrones: 4-metoxi- α -naftol (4MN) 1 mM ($\epsilon_{595} = 21,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) 3,2 mM ($\epsilon_{652} = 39,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad peroxidasa también se midió con los precursores de las ligninas a una concentración de 0,1 mM: alcohol coniferílico ($\epsilon_{262} = 9,75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), alcohol sinapílico ($\epsilon_{271} = 4,14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), coniferil aldehído ($\epsilon_{341} = 13,44 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y sinapil aldehído ($\epsilon_{340} = 11,95 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Ros Barceló y Pomar 2001). Para determinar las funciones en las que están implicadas las enzimas purificadas y calcular la cinética de las mismas además se usaron los siguientes sustratos: ácido ferúlico 50 μM ($\epsilon_{310} = 16,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ácido indolacético 200 μM ($\epsilon_{261} = 3,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ácido ascórbico 1mM ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y NADH 150 μM ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Ros Barceló y Pomar 2001; de Marco *et al.*, 1999; Gabaldón *et al.*, 2005). Para la medida de actividad peroxidasa con el ácido ascórbico se usó un tampón fosfato 50 mM

pH 7,0. La dependencia de la actividad enzimática del pH fue testada usando tampón Na-acetato 50 mM para el rango de pH de 4 a 6 y Tris-HCl 50 mM para el rango de pH de 7 a 9.

VI. Determinación de la cantidad de proteínas

Para determinar la cantidad de proteínas se siguió el método de Bradford (1976) utilizándose seroalbúmina bovina como proteína estándar para obtener la recta patrón.

VII. Análisis electroforéticos

VII.I. Isoelectroenfoque en placa

La preparación de los geles y el proceso de polimerización se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Wrigley (1971) con algunas modificaciones.

Composición de los geles

El medio de polimerización se componía de acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 6,5%, anfolinas de rango pH 3,5-9,5 al 2% (v/v) y glicerol al 5% (p/v). La mezcla se desgasificó usando una bomba de vacío durante 5 minutos y posteriormente se añadió persulfato amónico al 0,06% (p/v). Con una micropipeta se formaron láminas de gel que se dejaron polimerizar durante 90 minutos a 25°C.

Cargado de las muestras y desarrollo del isoelectroenfoque

Para llevar a cabo el enfoque se utilizó un sistema Multiphor II de Pharmacia-Biotech, manteniendo la temperatura constante a 4°C mediante un circuito cerrado de refrigeración conectado a un estabilizador de temperatura

Multitemp III de Amersham Pharmacia Biotech. En el interior de la cubeta se colocaron dos frascos con una solución de NaOH 1 M para permitir la disolución del CO₂ desprendido durante el isoelectroenfoque, ya que este CO₂ puede provocar variaciones en el gradiente de pH deseado. Los geles se colocaron sobre la placa de porcelana del Multiphor II depositándose entre el vidrio y la placa unas gotas de agua destilada para facilitar el desarrollo de una temperatura homogénea en toda la superficie del gel. Seguidamente, se colocaron unas bandas de isoelectroenfoque de Pharmacia empapadas en soluciones electrolíticas, NaOH 1 M para la banda del cátodo y H₃PO₄ 1 M para la banda del ánodo. A continuación se depositaron de 10 a 30 µl de muestra sobre los papeles de aplicación de 5 x 2 mm de tamaño, colocados encima del gel. Las condiciones del isoelectroenfoque para un gel de 8 cm de longitud fueron de 1500 V, 16 mA y 10 W durante 70 minutos.

Revelado de los geles

Para el revelado de las isoenzimas de la peroxidasa se usó un medio de tinción con 4-metoxi- α -naftol (4MN) 1 mM y H₂O₂ 0,33 mM en tampón Na-acetato 50 mM pH 5,0. Los geles se incubaron en este medio durante 15 minutos a 25°C en oscuridad y se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante (López-Serrano *et al.*, 2004).

VII.II. Electroforesis disociante (SDS-PAGE)

Se realizó según el protocolo descrito por Laemmli (1970) con ligeras modificaciones. Las proteínas se desnaturalizaron por calentamiento en un baño en ebullición durante 10 minutos, en presencia de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, glicerol 8%, SDS 0,7 % (p/v) y azul de bromofenol 0,01 %.

Los marcadores de peso molecular utilizados (Fermentas Life Sciences, cat. SM0661) fueron de amplio rango, de 10 a 200 kDa.

Preparación de los geles y desarrollo de la electroforesis

El gel separador (1 mm de espesor) se preparó con tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, conteniendo acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 10%, SDS al 0,1%, TEMED al 0,15% y persulfato amónico al 0,05%, dejándose 30 minutos para su polimerización.

El gel concentrador se preparó con tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 conteniendo acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 4%, SDS al 0,1%, TEMED al 0,2% y persulfato amónico al 0,08%, dejándose 30 minutos para su polimerización.

La migración de las bandas sobre el gel se llevó a cabo en una cubeta MiniProtean 3 de Bio-Rad con tampón glicina 192 mM, Tris 25 mM, pH 8,3, conteniendo SDS al 0,1%. El voltaje aplicado, con una fuente de alimentación Bio-Rad Power-Pac 1000, fue de 200 V durante 45 minutos.

Tinción de los geles con plata

Tras la electroforesis, las proteínas se tiñeron con el método del nitrato de plata (Oakley *et al.*, 1980) usando el kit Plus One Silver Staining. Para ello, el gel se fijó durante 30 minutos en etanol al 40% y ácido acético al 10%. Posteriormente se incubó durante 30 minutos en una solución sensibilizadora que contenía glutaraldehído al 0,125%, tiosulfato sódico al 0,2%, acetato sódico al 6,8% y etanol al 30%. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua destilada, y seguidamente se procedió a la tinción del gel con una solución de plata compuesta por nitrato de plata al 0,25% y formaldehído al 0,015% durante 20 minutos. Se volvió a lavar el gel con agua destilada (2 veces) y las proteínas se revelaron en una solución que contenía carbonato sódico al 2,5% y formaldehído al 0,0074%. Finalmente, la reacción se detuvo con una solución que contenía EDTA- Na_2 al 1,46%. Los geles se conservaron en agua destilada hasta que se fotografiaron.

Tinción con azul de Coomassie

Las proteínas purificadas se revelaron usando un medio de tinción que contenía azul brillante de Coomassie al 0,2%, metanol al 45%, ácido acético al 10% y ácido tricloroacético al 10%. El gel se incubó 3 horas en agitación a 25°C, periodo tras el cual pasó a decolorarse con una solución compuesta por metanol al 20%, ácido acético al 10% y glicerol al 10%. La decoloración se llevó a cabo durante toda la noche en agitación a 25°C.

VIII. Análisis de datos cinéticos

Para determinar la K_M aparente y la V_{max} de las peroxidasas purificadas de *P. patens* y *S. martensii* se emplearon cuatro sustratos a diferentes concentraciones: alcohol coniferílico 5-100 μ M, alcohol sinapílico 1-120 μ M, ácido ferúlico 1-50 μ M y peróxido de hidrógeno 0,025 -1 mM, empleándose tampón Na-acetato 50 mM pH 5,0.

Los valores de K_M y V_{max} se determinaron con la ecuación de Lineweaver-Burk, una transformación lineal de la ecuación de Michaelis-Menten.

IX. Tratamientos de los cultivos líquidos de *P. patens*

Los cultivos líquidos de *P. patens* de 7 días se pusieron bajo diversos tipos de estrés para estudiar la actividad y la expresión de peroxidasas en *P. patens*. Se utilizaron ácido abscísico (ABA) con una concentración de 10 μ M (Richardt *et al.*, 2010), cloruro sódico a una concentración 250 mM (Kroemer *et al.*, 2004) y manitol con una concentración 250 mM (Minami *et al.*, 2003).

Se empleó también ácido salicílico (SA), con el cual se realizaron pruebas con diferentes concentraciones, 1, 5 y 20 mM, tras las cuales se escogió la de 1 mM para los tratamientos.

Se realizaron además tratamientos con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para escoger la concentración idónea para trabajar se hicieron pruebas con 0,5, 5 y 50 mM, tras las cuales se optó por la concentración 5 mM. Para realizar este tratamiento se utilizó un control con H₂O₂ (5 mM) y ácido ascórbico (10 mM).

X. Extracción y cuantificación de fenoles

Se utilizaron muestras obtenidas 96 horas tras los diversos tratamientos. Las muestras se homogenizaron en metanol al 80% y se incubaron durante 30 min a 80°C. Tras una centrifugación a 4000g durante 5 min se recogió el sobrenadante, se añadió agua y se evaporó el metanol en un evaporador rotatorio (Buchi R-200) a 45°C. El residuo acuoso se extrajo 3 veces con acetato de etilo, se eliminaron los restos de agua con sulfato sódico, se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio y se resuspendió en 1 ml de metanol.

El contenido de fenoles se determinó usando el reactivo Folin–Ciocalteu de acuerdo con Singleton y Rossi (1965) y se calculó empleando ácido ferúlico como patrón.

XI. Análisis proteómicos

Los análisis proteómicos se realizaron en el INIBIC, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña. Estos análisis se utilizaron para determinar el peso molecular de las proteínas purificadas de *S. martensii* así como para adquirir los espectros de masas de las mismas y su huella peptídica.

También se llevaron a cabo análisis proteómicos para estudiar el secretoma radicular de *P. patens* a lo largo del desarrollo.

XI.I. Determinación del peso molecular mediante MALDI-TOF MS

Las proteínas purificadas de *P. patens* y *S. martensii* se analizaron mediante MALDI-TOF MS para determinar su peso molecular, utilizando ácido sinapínico como matriz. Las proteínas se implantan en la matriz sólida que las protege absorbiendo la energía de un láser y disipándola, lo que facilita la coevaporación y la ionización de la muestra. Seguidamente las biomoléculas son irradiadas con un láser pulsado de nitrógeno, la energía del láser expulsa iones de la matriz electrónicamente excitados, cationes y macromoléculas neutrales, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra. Las macromoléculas cargadas son dirigidas al analizador mediante un campo eléctrico donde se determina su masa de acuerdo a su tiempo de vuelo.

XI.II. Digestión de proteínas con tripsina y adquisición de espectros MS/MS

Las peroxidasas purificadas de *Selaginella martensii* fueron cargadas en un gel de SDS-PAGE y teñidas con azul de coomassie. Fueron troceadas y digeridas con tripsina (6 ng μl^{-1} , Roche) durante 16 horas a 37°C, para lo cual fue necesario desecar la muestra con acetonitrilo, reducirla con DTT y alquilarla con yodoacetamida (Shevchenko *et al.*, 2006). Tras la digestión, la muestra se secó al vacío en un Speed-Vac, resuspendiéndose en ácido trifluoroacético al 0,1% y desalándose posteriormente para extraer los péptidos.

Las muestras se analizaron mediante MALDI-TOF/TOF (4800 ABSciex), usándose el software Explorer 4000 v.4.2 para generar los espectros y las listas de picos. Las adquisiciones de MS se obtuvieron con un láser de 3800 kV y 1500 disparos/espectro. La fragmentación del espectro se hizo con un promedio de 2000 disparos seleccionando los 20 iones más abundantes de cada huella peptídica obtenida en el MALDI-TOF (excluyendo

la tripsina). Para el análisis de datos se tuvo en cuenta un umbral de relación señal/ruido de 20, con una superficie mínima de 100 y una resolución mayor de 10000 con una precisión de masa de 20 ppm. Para la identificación de las proteínas y la búsqueda en la base de datos se empleó el programa Mascot v.19 (www.matrixscience.com). Se seleccionaron más de 50 picos en la huella peptídica por su intensidad y 50 picos por precursor de la identificación mediante MS/MS; para la búsqueda en las bases de datos se desecharon tanto los picos de tripsina como los de queratina, productos de la manipulación de la muestra. Los resultados en Mascot para todas las identificaciones fueron mayores que el umbral aceptado para obtener un resultado significativo (para un $p < 0,050$, la tasa de positivos medidos es de 0,047).

La búsqueda mediante las huellas peptídicas y los espectros en tándem se realizaron en la base de datos NCBI nr sin restricción taxonómica, considerándose las modificaciones fijas y variables (Cys como S-carbamidometil y Met como metionina oxidada).

XI.III. Precipitación de proteínas del secretoma radicular de *P. patens*

La precipitación de las proteínas del secretoma radicular de suspensiones líquidas de *P. patens* se realizó a los 7 y a los 28 días de cultivo, mediante dos métodos diferentes, precipitación con sulfato amónico y precipitación con ácido tricloroacético (TCA)-acetona. La precipitación con sulfato amónico se hizo al 95% tal como se explicó en apartados anteriores. El método del TCA-acetona se llevó a cabo según Damerval *et al.* (1986) con modificaciones. El secretoma radicular se precipitó añadiendo cuatro volúmenes de acetona fría con un 10% de TCA y β -mercaptoetanol al 0,07% (p/v). Las muestras se incubaron a -20°C toda la noche y luego se centrifugaron durante 40 minutos a 1600g. El precipitado se lavó con acetona fría con 0,07% (p/v) de β -mercaptoetanol y se centrifugó otra vez durante 5 minutos a 3500g. En ambos métodos de extracción los precipitados se liofilizaron y se resuspendieron en un tampón con urea 6 M, tiourea 2 M y

bicarbonato amónico 25 mM. Las muestras se sonicaron para eliminar el material insoluble por centrifugación.

XI.III.I. Fraccionamiento en gel

Por cada muestra se cargaron 30 µg de proteína en un gel de SDS-PAGE al 10% de acrilamida en un gel de Protean[®] mini-gel (Bio-Rad, Hercules, (CA), EE.UU.). Los geles se tiñeron ligeramente con azul de Coomassie durante 10 minutos para comprobar la integridad de la proteína. Cada carril fue fraccionado en 3 secciones que se procesaron posteriormente de forma independiente. Cada sección fue desteñida con metanol, dividida en dos partes iguales para crear dos réplicas experimentales, cortada en trozos pequeños y digeridas siguiendo un procedimiento estándar (Shevchenko *et al.*, 2006). Las muestras se desecaron brevemente con acetonitrilo, se redujeron con DTT, se alquilaron con yodoacetamida y se digirieron con tripsina (6 ng l⁻¹, Promega MScgold, Madison, (WI), EE.UU.) durante 16 horas a 37°C. Los péptidos se extrajeron, se secaron en un Speed-Vac, se reconstituyeron en 0,1% de ácido trifluoroacético y se desalaron utilizando nu-tipC18 (Glygen, Columbia, (MA), EE.UU.)

Los fragmentos peptídicos se separaron mediante cromatografía de fase inversa en un sistema de nanoLC (Tempo, Eksigent, Dublín, (CA), EE.UU.) mediante carga en una columna de base de sílice C18 (New Objective, Woburn, MA, USA) con un diámetro interno de 300 Å. Los péptidos se eluyeron a un caudal de 0,35 µl min⁻¹ durante 30 min en un gradiente lineal del 2 al 40% (fase móvil A: 0,1% de ácido trifluoroacético y acetonitrilo al 2%; fase móvil B: 0,1% de ácido trifluoroacético 96% de acetonitrilo). Se mezcló con una matriz de α-ciano (4 mg ml⁻¹ a un caudal de 1,2 µl min⁻¹) y se depositó sobre una placa MALDI usando un sistema automático de spotter (Sun Collect, Sunchrome, Friedrichsdorf, Alemania). Los cromatogramas correspondientes a cada sección del gel fueron compuestos por 10 spots, comprendiendo cada uno una deposición a 15 s. Las MS obtenidas fueron analizadas como se explica en el apartado XI.II.

XII. Técnicas bioinformáticas

La presencia de péptidos señal fue predicha usando el programa TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). La predicción del pI se hizo usando la herramienta Compute pI/MW del ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi). La búsqueda de secuencias de proteínas homólogas se realizó mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y los alineamientos de proteínas se realizaron usando el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), programa que se encuentra en el portal del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI). ClustalW2 es un programa de alineamientos de secuencias múltiples para ADN o proteínas. Este programa construye el alineamiento de secuencias múltiples biológicamente significativas a partir de secuencias divergentes. Calcula, mediante algoritmos, el mejor resultado para las secuencias seleccionadas y las alinea de manera que las similitudes y diferencias entre las secuencias son fácilmente apreciables (Thompson *et al.*, 1994).

XII.I. Búsqueda de secuencias homólogas

La búsqueda de secuencias homólogas se realizó mediante la técnica algorítmica BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El BLAST constituye una herramienta muy útil para la búsqueda de alineamientos locales básicos y proporciona información sobre la estructura y la función de la nueva proteína encontrada. Las condiciones en las que se realizó el blast fueron las especificadas por defecto en la página del EBI, excepto en aquellos casos en los que era necesario ampliar la búsqueda, para los cuales se disminuyó el umbral, o se quitó el filtro para encontrar un mayor número de secuencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Estudio de las peroxidasas relacionadas con
la lignificación en briófitos**

**I. Estudio de las peroxidasas relacionadas con la
lignificación en *Marchantia polymorpha***

I.I. Localización histoquímica de peroxidadasas y ligninas

Ligrone *et al.* (2008) y Espiñeira *et al.* (2011) han descrito mediante inmunohistoquímica y tioacidolisis, respectivamente, la presencia de ligninas en *M. polymorpha*, tanto monómeros *p*-hidroxifenilo como guayacilo y siringilo, en una proporción H:G:S de 14:80:6. Graham *et al.* (2004) realizaron estudios con fluorescencia, mediante los cuales pudieron determinar que en *M. polymorpha* aparecían compuestos fenólicos en la pared celular. Estos compuestos se situaban principalmente en la epidermis inferior y en los rizoides (Fig. 21A), otorgando a la planta dureza y protección, tal como hacen las ligninas. Para determinar la presencia de ligninas y su distribución espacial en *M. polymorpha*, se hicieron cortes histológicos de esta planta, y para comprobar si la fluorescencia determinada por Graham *et al.* (2004) venía dada por las ligninas, se realizaron dos métodos distintos de tinción, el test de Wiesner (Fig. 21B) y el test de Mäule (Fig. 21C).

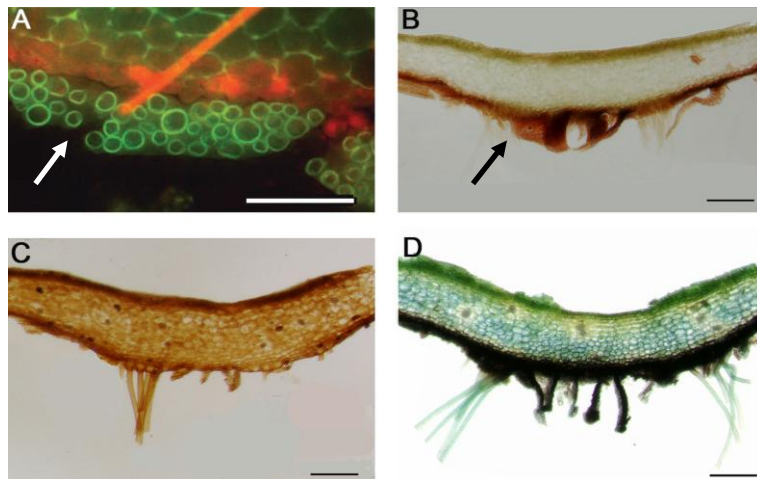


Figura 21. Localización histoquímica de ligninas en *M. polymorpha* mediante autofluorescencia (Imagen tomada de Graham *et al.* (2004)) (A), el test de Wiesner (B) y el test de Mäule (C). Tinción con TMB para localizar la actividad peroxidasa (verde) (D). Flecha blanca; autofluorescencia verde que muestra la presencia de ligninas con excitación a 400 nm. Flecha negra; coloración roja indicando la presencia de ligninas. Barra 100 μ m.

El test de Wiesner, una tinción específica para los grupos cinamaldehído presentes en las ligninas (Pomar *et al.*, 2002), permite comprobar una acumulación de ligninas en los rizoides (Fig. 21B). Sin embargo con el test de Mäule, una reacción específica para grupos siringilo, aparece la totalidad del tejido teñido de manera difusa (Fig. 21C), por lo que los resultados con esta tinción, no parecen ser concluyentes.

Con objeto de determinar la distribución espacial de peroxidasas se hizo una tinción con TMB (Fig. 21D), que mostró la localización de dichas proteínas mayoritariamente en la epidermis superior, así como en los rizoides, el parénquima de almacenamiento y el clorénquima. A la vista de estos resultados parece existir una colocalización de peroxidasas y ligninas en los rizoides. Dicho fenómeno de colocalización ha sido ampliamente descrito, otorgándole un papel a las isoenzimas de peroxidasa en la formación de lignina (Gómez Ros *et al.*, 2007a; Sato *et al.*, 2009).

I.II. Estudio de las peroxidasas de *M. polymorpha*

Las peroxidasas básicas han sido descritas como responsables de la oxidación del alcohol sinapílico en varios trabajos (Ros Barceló y Pomar, 2001; Marjamaa *et al.*, 2006), especialmente la peroxidasa básica de *Zinnia elegans* (Gabaldón *et al.*, 2005). *M. polymorpha* contiene peroxidasas de tipo siringilo, las cuales tienen capacidad para oxidar los grupos S (Españeira *et al.*, 2011). Este tipo de peroxidasas están estrechamente ligadas a los procesos de lignificación, ya que los grupos siringilo sólo están presentes en las ligninas (Ros Barceló *et al.*, 2007). Para comprobar si *M. polymorpha* contiene peroxidasas homólogas a la de *Z. elegans* se estudió el patrón de isoenzimas de peroxidasa de un extracto total de proteína de los tallos de *M. polymorpha*, por medio de un análisis isoelectroforético (Fig. 22).

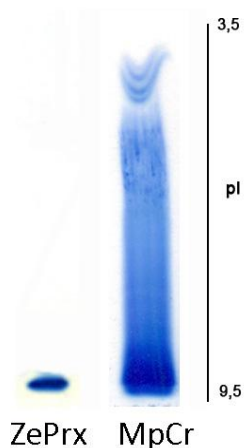


Figura 22. Isoelectroenfoque en condiciones de equilibrio de la peroxidasa de *Z. elegans* (ZePrx) y el extracto crudo de *M. polymorpha* (MpCr) después de teñir con 4MN y H₂O₂.

Los resultados muestran la presencia de peroxidasas ácidas, moderadamente básicas y fuertemente básicas (Fig. 22). Entre estas últimas hay varias isoenzimas que concuerdan con el pI de la peroxidasa responsable de la lignificación en *Z. elegans* (Gabaldón *et al.*, 2005), por lo que podrían estar relacionadas con la lignificación en *M. polymorpha*.

Espiñeira *et al.* (2011) observaron que un extracto de proteína total de los talos de *M. polymorpha* contenía peroxidasas capaces de oxidar el sinapil aldehído, precursor de las ligninas S. Para confirmar la presencia de peroxidasas capaces de oxidar a los precursores de las ligninas se realizaron medidas de la actividad enzimática con dos sustratos naturales, los alcoholes coniferílico y sinapílico (precursores de las ligninas de tipo G y S respectivamente) y con dos sustratos artificiales de las peroxidasas, el 4MN y la TMB (Tabla 3).

Tabla 3. Medida de la actividad peroxidasa del extracto crudo de *M. polymorpha*. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con la desviación estándar.

	Actividad peroxidasa ($\mu\text{kat ml}^{-1}$)
4-metoxi-α-naftol	2,72 \pm 0,09
3,3',5,5'-tetrametilbencidina	2,97 \pm 0,09
Alcohol coniferílico	0,58 \pm 0,03
Alcohol sinapílico	0,09 \pm 0,00

Las medidas de actividad indican que las peroxidasas de *M. polymorpha* oxidan a todos los sustratos probados, tanto naturales como artificiales. Con anterioridad se ha establecido que tanto las isoenzimas básicas como las ácidas son capaces de oxidar al alcohol coniferílico, aunque no es tan evidente en el caso del alcohol sinapílico (Ros Barceló *et al.*, 2004). Estos resultados muestran que la TMB y el 4MN poseen una actividad peroxidasa similar, pero el extracto también presenta actividad frente a los alcoholes coniferílico y sinapílico (Tabla 3). Estos alcoholes dan lugar respectivamente a las unidades guayacilo y siringilo, por lo que son dos sustratos determinantes a la hora de comprobar si las peroxidasas de *M. polymorpha* participan en la lignificación.

El hecho de que *M. polymorpha* presente al mismo tiempo capacidad para oxidar a los sustratos citados e isoenzimas homólogas a la de *Z. elegans* podría indicar la presencia de peroxidasas implicadas en la lignificación. Por este motivo, y tras los resultados obtenidos anteriormente, se planteó purificar las peroxidasas que pudieran estar implicadas en el proceso de lignificación en esta especie.

I.III. Purificación parcial de peroxidadasas básicas de *M. polymorpha*

Para la purificación de las peroxidadasas se realizó un protocolo de tres pasos que comprendía una precipitación inicial con sulfato amónico, una cromatografía hidrofóbica en Fenil-Sefarosa y una cromatografía catiónica en SP Sefarosa.

El primer paso fue una precipitación con sulfato amónico para determinar, de acuerdo con los patrones de proteína y peroxidada, qué fracciones contenían nuestras proteínas de interés. Se obtuvieron tres fracciones con diferentes concentraciones de sulfato amónico: 0-50, 50-65 y 65-95% (Fig. 23A, B).

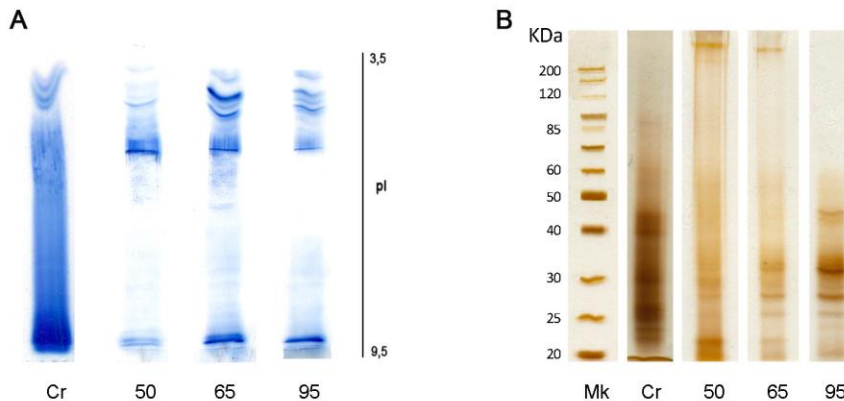


Figura 23. Precipitación fraccionada de *M. polymorpha*. Patrones de isoenzimas de peroxidada obtenidos por IEF (A) y de proteínas mediante SDS-PAGE (B) de las fracciones obtenidas con porcentajes diferentes de sulfato amónico 0-50, 50-65 y 65-95%. Cr: Extracto crudo. Mk: Marcador de peso molecular.

La fracción del 0 al 50% mostraba una menor cantidad de peroxidadasas básicas y una mayor cantidad de proteínas que las otras fracciones obtenidas (Fig. 23). La fracción del 50 al 65% tenía un patrón similar al de la fracción del 65 al 95% tanto de peroxidadasas (Fig. 23A) como de proteínas (Fig. 23B), pero con una mayor cantidad de peroxidadasas y menos proteínas. Debido a que

ambas fracciones contenían un patrón electroforético similar y con el fin de simplificar el proceso de purificación se optó por trabajar con la fracción del 65 al 95%, la cual contenía una cantidad de proteínas suficiente para el proceso de purificación y a su vez un patrón de peroxidasas sencillo.

La fracción del 65-95% se cromatografió sobre una columna de Fenil-SefarosaTM 6 Fast Flow basada en las diferencias de hidrofobicidad de las proteínas bajo ciertas condiciones del medio que las rodea. Esta es la matriz más empleada para fijar las proteínas por hidrofobicidad, y se ha utilizado con éxito en la purificación de la peroxidasa de tomate (Jen *et al.*, 1980), de soja (Flurkey *et al.*, 1978), de *Z. elegans* (Gabaldón *et al.*, 2005) y de *G. biloba* (Novo-Uzal *et al.*, 2009a). Por lo tanto ha sido, y sigue siendo, uno de los pasos más utilizados para la purificación de las peroxidasas. Chavez y Flurkey, (1984), trabajando con columnas de geles empaquetados, modificados con diferentes grupos funcionales (alquilo o fenilo), observaron que las peroxidasas de rábano y tomate, bajo condiciones de interacción hidrofóbica, se ligan en mayor extensión a los geles modificados con grupos fenilo. En base a esto, sugirieron que la interacción de la peroxidasa con estos geles, además de ser hidrofóbica, también presenta una adsorción bioespecífica que debe estar basada en la similitud estructural que tienen los grupos fenilo con la mayoría de los sustratos naturales de la enzima (fenoles).

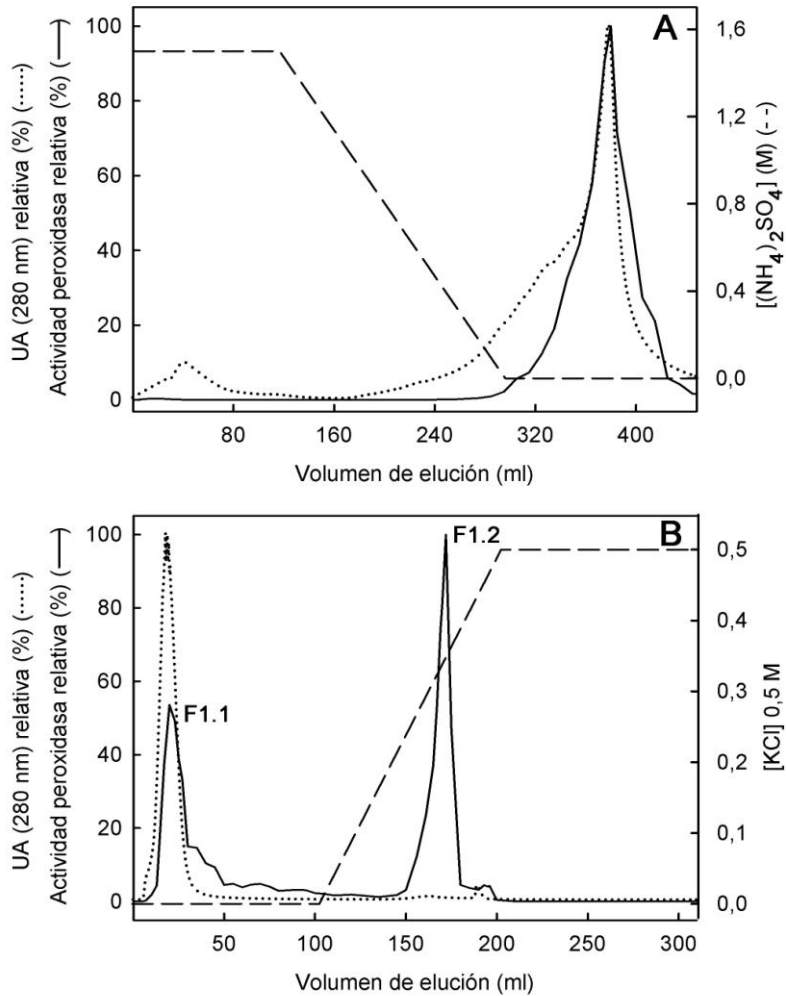


Figura 24. Purificación de la peroxidasa MpPrx de *M. polymorpha*. Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow del extracto crudo de *M. polymorpha* procedente de la precipitación con sulfato amónico del 65-95 % (A). Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sefarosa™ Fast Flow de la fracción obtenida de la cromatografía hidrofóbica de *M. polymorpha* (B) La actividad peroxidasa se corresponde a los valores medidos con TMB.

Tras la realización de esta cromatografía, los resultados mostraron la aparición de un único pico de actividad peroxidasa (Fig. 24A), que seguidamente se sometió a una cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sefarosa™ Fast Flow (Fig. 24B). Debido a que en en la fracción obtenida de la

primera cromatografía hay una gran cantidad de isoenzimas tanto neutras como ácidas se optó por emplear un tampón de pH neutro con un gradiente creciente de KCl para eluir las peroxidadas de la columna.

En el cromatograma de la cromatografía catiónica se distingue la presencia de dos picos de actividad peroxidasa, F1.1 y F1.2 (Fig. 24B). La matriz retiene las enzimas básicas, por lo que el primer pico, F1.1 se corresponde con una fracción compuesta de peroxidadas ácidas y neutras, las cuales no son retenidas por la misma, mientras que el pico F1.2 se corresponde con una fracción de peroxidadas básicas que eluyen a una concentración de KCl de 0,33 M (Fig. 24B).

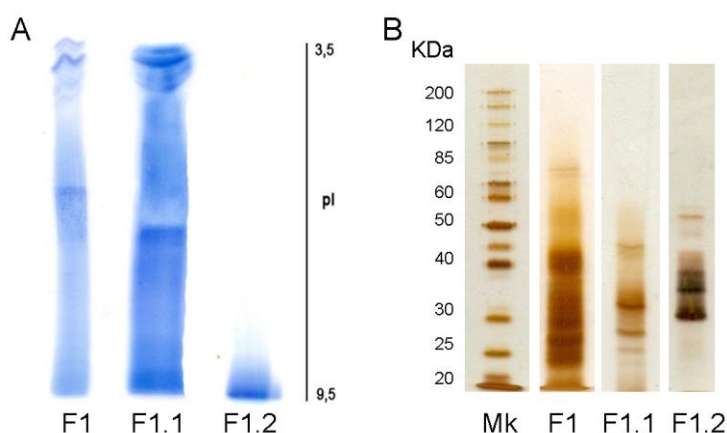


Figura 25. Isoelectroenfoque de la fracción obtenida tras la cromatografía hidrofóbica del extracto crudo de *M. polymorpha* (F1) y la cromatografía catiónica (F1.1 y F1.2) después de teñir con 4MN y H₂O₂ (A). Análisis mediante SDS-PAGE de las mismas fracciones, después de teñir con nitrato de plata (B). Mk: Marcador de peso molecular.

Mediante IEF (Fig. 25A) se reveló que la fracción obtenida tras la cromatografía hidrofóbica contenía tanto isoenzimas de peroxidadas neutras como ácidas y básicas. La fracción F1.1 contenía una gran cantidad de isoenzimas tanto ácidas como básicas, sin embargo, en la F1.2 aparecía una fracción de peroxidadas de carácter fuertemente básico. El patrón proteico de las cromatografías hidrofóbica y catiónica se determinó mediante SDS-PAGE

(Fig. 25B) mostrando la complejidad en el patrón proteico de ambas, aunque en la fracción correspondiente a la F1.2, que se corresponde con el patrón de peroxidasas más sencillo, las proteínas tienen un peso molecular de entre 30 y 40 KDa, coincidiendo con el peso molecular de las peroxidasas de secreción de clase III (Hiraga *et al.*, 2001).

La tabla de purificación de la fracción semipurificada de peroxidasas básicas (F1.2) (Tabla 4) indica un aumento notable en la actividad específica de esta fracción a lo largo del proceso de purificación.

Tabla 4. Purificación de la fracción MpPrx de *M. polymorpha*. La actividad peroxidasa fue medida con TMB como sustrato. AE: actividad específica.

	Actividad peroxidasa (nkat)	AE (nkat mg ⁻¹ proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	619622	3050	1	100
Precipitación 65-95% (NH₄)₂SO₄	641722	10794	4	104
Cromatografía Fenil-Sefarosa	135934	8501	3	22
Cromatografía SP Sefarosa	20145	287780	94	3

Debido a la baja cantidad de proteínas (71 µg totales) en la muestra final, no fue posible continuar el proceso de purificación por lo que hemos considerado la fracción F1.2, ahora denominada MpPrx como una fracción de peroxidasas básicas semipurificada.

I.IV. Especificidad de sustrato

La fracción de peroxidasas semipurificada MpPrx se utilizó para medir su actividad enzimática con ácido ascórbico, NADH, ácido indolacético (AIA), ácido ferúlico y los alcoholes coniferílico y sinapílico. Los sustratos

seleccionados para la realización de las medidas permiten valorar las posibles funciones de esta fracción semipurificada.

El ácido ascórbico se encuentra en abundancia en los tejidos vegetales, y actúa como reductor de muchos radicales libres minimizando el daño causado por el estrés oxidativo. Además, es un sustrato empleado principalmente por las peroxidasas de clase I, siendo un mal sustrato para las de clase III (De Gara, 2004). El NADH proporciona energía al proceso de la expansión celular desviando una gran proporción de electrones de los citocromos en la cadena respiratoria, de modo que este sustrato está relacionado con el relajamiento de la pared celular en procesos como el crecimiento (Liszky *et al.*, 2004). El AIA es la principal auxina endógena de las plantas y puede ser catalizado por peroxidasas *in vivo*, por lo que se relaciona con el crecimiento celular (Gazaryan *et al.*, 1996). Otro sustrato relacionado con la pared celular es el ácido ferúlico, que puede estar unido por enlaces éter a los componentes hemicelulósicos y puede proveer puntos de crecimiento al polímero de lignina (Jacquet *et al.*, 1995), además también puede ser incorporado en la suberina de la pared celular (Hiraga *et al.*, 2001).

Tabla 5. Actividad específica de la fracción de peroxidasas catiónicas de *M. polymorpha* en presencia de diferentes sustratos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con la desviación estándar. N.d: no detectado.

Sustrato	Actividad específica (nkat μg^{-1} proteína)
Ácido ascórbico	n.d
NADH	n.d
AIA	0,03 \pm 0,00
Ácido ferúlico	13,62 \pm 0,02
Alcohol coniferílico	15,95 \pm 0,01
Alcohol sinapílico	6,40 \pm 0,01

Los resultados de la tabla 5 muestran que la fracción MpPrx es capaz de oxidar todos los sustratos a excepción del ácido ascórbico y el NADH, lo que parece indicar que las peroxidases de esta fracción pertenecen a las peroxidases vegetales de secreción de clase III.

La fracción MpPrx muestra una alta actividad enzimática con el ácido ferúlico ($13,62 \pm 0,02$ nkat μg^{-1} proteína), lo que parece indicar que esta fracción está relacionada con el desarrollo de la pared celular. A su vez, presenta una mayor actividad enzimática frente al alcohol coniferílico ($15,95 \pm 0,01$ nkat μg^{-1} proteína), hecho que está relacionado con la biosíntesis de monómeros guayacilo de las ligninas. En cuanto a la actividad frente al alcohol sinapílico ($6,40 \pm 0,01$ nkat μg^{-1} proteína) parece indicar la capacidad de esta fracción enzimática para producir monómeros siringilo.

La presencia de ligninas determinada por la tinción de Wiesner y su colocalización con la actividad peroxidasa en los rizoides, junto con los datos de actividad específica de la fracción semipurificada MpPrx nos llevan a concluir que la mezcla proteica MpPrx está constituida por peroxidases de secreción de clase III. Además el patrón isoelectroforético de esta fracción de peroxidases muestra que son de carácter muy básico, muy similar al pI de la peroxidasa purificada responsable de la lignificación en *Z. elegans* (Gabaldón *et al.*, 2005).

Esto, junto con los datos de especificidad de los diversos sustratos probados apoya el hecho de que esta fracción está implicada en la lignificación de *M. polymorpha*.

**II. Estudio de las peroxidasas básicas de
*Physcomitrella patens***

II.I. Estudio de las peroxidasas de *P. patens*

P. patens, que pertenece a la subclase Bryidae dentro del grupo de los musgos verdaderos, muestra un sistema conductor de agua interno que contiene hidroides y células vivas con paredes engrosadas (estereidas) que no lignifican (Ligrone *et al.*, 2000; Espiñeira *et al.*, 2011), aunque sí posee grupos polifenólicos similares a ligninas (Espiñeira *et al.*, 2011).

Existen numerosos trabajos con diferentes briófitos que discuten la posible presencia de ligninas en las paredes celulares. Siegel (1969) comprobó mediante análisis histoquímicos la tinción positiva de las paredes celulares de los hidroides de musgos de los géneros *Dawsonia* y *Dendroligotrichum*, tanto con el test de Mäule como con el test de Wiesner. Este último test también fue empleado para detectar ligninas en *Sphagnum zelandicum* y otros briófitos, obteniendo un resultado negativo (Kremer *et al.*, 2004; Ligrone *et al.*, 2008). Sin embargo, Ligrone *et al.* (2008) determinaron mediante inmunohistoquímica con marcadores policlonales la presencia de ligninas en diversos briófitos y que la señal de marcaje de los anticuerpos era más fuerte para los polímeros GS que para los G, especialmente en *S. cuspidatum* y *Dendroligotrichum dendroides*, cuya señal dada por la detección inmunohistoquímica fue similar a la de las plantas vasculares.

P. patens posee peroxidasas con capacidad de oxidar los alcoholes coniferílico y sinápilico, sustratos implicados en la formación de unidades G y S respectivamente, a pesar de no contener ligninas (Espiñeira *et al.*, 2011). Además contiene los genes que codifican para las enzimas de la ruta biosintética de las ligninas, a excepción de la F5H que cataliza la formación de ligninas S (Xu *et al.*, 2009).

Todo esto hace interesante el estudio de las peroxidasas de esta especie y su caracterización, para ver cómo actúan y si hay alguna con analogía a la peroxidasa básica implicada en la lignificación de *Z. elegans* (Gabaldón *et al.*, 2005).

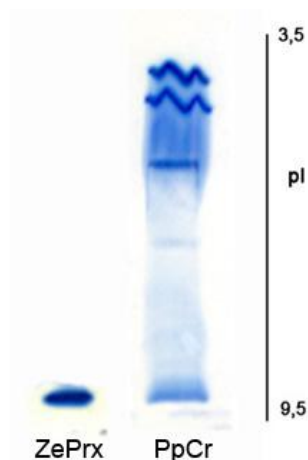


Figura 26. Isoelectroenfoque en condiciones de equilibrio de la peroxidasa de *Z. elegans* (ZePrx) y el extracto crudo de *P. patens* (PpCr) después de teñir con 4MN y H₂O₂.

Se comprobó el patrón enzimático del extracto crudo de *P. patens* y se comparó con la peroxidasa implicada en la lignificación de *Z. elegans*. El extracto crudo mostró la presencia de peroxidasas ácidas, moderadamente básicas y fuertemente básicas, algunas análogas a la peroxidasa básica de *Z. elegans* (Fig. 26). Así mismo se realizaron medidas de actividad peroxidasa con diferentes sustratos para comprobar la capacidad de oxidación de éstos por el extracto crudo. Los sustratos escogidos fueron el 4MN, la TMB y los alcoholes coniferílico y sinapílico (Tabla 6).

Tabla 6. Medida de la actividad peroxidasa del extracto crudo de *P. patens*. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con la desviación estándar.

	Actividad peroxidasa ($\mu\text{kat ml}^{-1}$)
4-metoxi- α -naftol	0,085 \pm 0,003
3,3',5,5'-tetrametilbencidina	1,246 \pm 0,076
Alcohol coniferílico	0,013 \pm 0,001
Alcohol sinapílico	0,009 \pm 0,001

Las peroxididasas del extracto crudo de *P. patens* mostraron una mayor sensibilidad por la TMB, aunque el hecho de que el extracto crudo sea capaz de oxidar a los alcoholes coniferílico y sinapílico podría estar relacionado con que alguna de sus enzimas estuviera implicada en el desarrollo de la pared celular. Debido a esta capacidad del extracto crudo y las características previamente mencionadas, se hace necesario un estudio en profundidad de las peroxididasas de *P. patens* que puedan estar implicadas en el desarrollo de la pared celular y que tengan la capacidad para oxidar a los alcoholes coniferílico y sinapílico.

II.II. Purificación de peroxididasas básicas de *P. patens*

Para la purificación de las peroxididasas básicas de *P. patens* se realizó un protocolo de tres pasos incluyendo: precipitación con sulfato amónico, cromatografía hidrofóbica en Fenil-Sefarosa y cromatografía catiónica en SP Sefarosa.

El primer paso fue una precipitación con sulfato amónico para determinar, de acuerdo con los patrones de proteína y peroxidasa, qué fracciones contenían las proteínas de interés. Se realizaron fracciones con diferentes concentraciones de sulfato amónico: 0-25, 25-40, 40-50, 50-65, 65-80 y 80-95%.

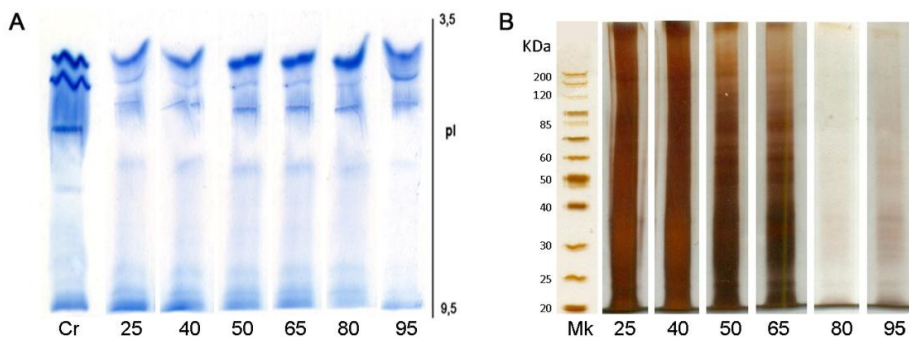


Figura 27. Precipitación fraccionada de *P. patens*. Patrones de isoenzimas de peroxidasa obtenidos por IEF (A) y de proteínas mediante SDS-PAGE (B) de las fracciones obtenidas con porcentajes diferentes de sulfato amónico 0-25, 25-40, 40-50, 50-65 y 65-80 y 80-95%. Cr: Extracto crudo. Mk: Marcador de peso molecular.

Como se observa en la figura 27, la precipitación fraccionada no permitió una separación eficiente de las proteínas y las peroxidasa, por lo que se decidió precipitar todo el material con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 95%. A continuación esta fracción se cromatografió en una columna de Fenil-Sefarosa™ 6 Fast.

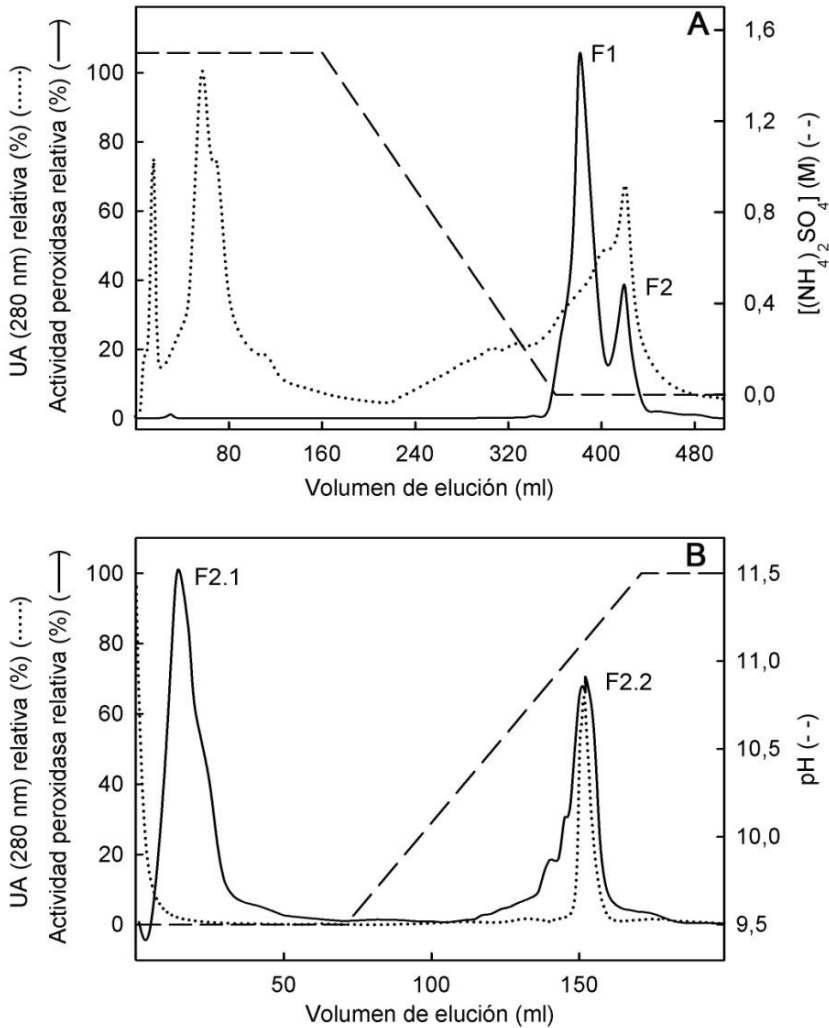


Figura 28. Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow del extracto crudo de *P. patens* procedente de la precipitación con sulfato amónico al 95 % (A) y tras el intercambio iónico sobre SP Sefarosa™ Fast Flow (B). La actividad peroxidasa se corresponde a los valores medidos con TMB.

Tras la realización de esta cromatografía, los resultados muestran la aparición de dos picos de actividad peroxidasa (F1 y F2) (Fig. 28A). Cada uno de los picos obtenidos de la cromatografía hidrofóbica se concentró y dializó simultáneamente frente a un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Mediante IEF (Fig. 29A) se reveló que la fracción F1 contenía peroxidasas ácidas, mientras que la fracción F2 contenía tanto isoenzimas de peroxidasas neutras como ácidas y básicas. Esta fracción también presentó un patrón complejo de proteínas (Fig. 29B). La fracción F2 procedente de la cromatografía hidrofóbica se sometió a una cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sefarosa™ Fast Flow (Fig. 28B). Debido a la complejidad isoenzimática de esta fracción se optó por emplear un tampón con un gradiente creciente de pH.

En el cromatograma de la fracción F2 se distingue la presencia de dos picos de actividad peroxidasa, F2.1 y F2.2 (Fig. 28B). La matriz retiene las proteínas básicas, por lo que el primer pico (F2.1) se corresponde con una fracción compuesta de peroxidasas ácidas y neutras, las cuales no son retenidas por la misma, mientras que el pico F2.2 se corresponde con una fracción básica que eluyó a un pH de 10,9 (Fig. 28B).

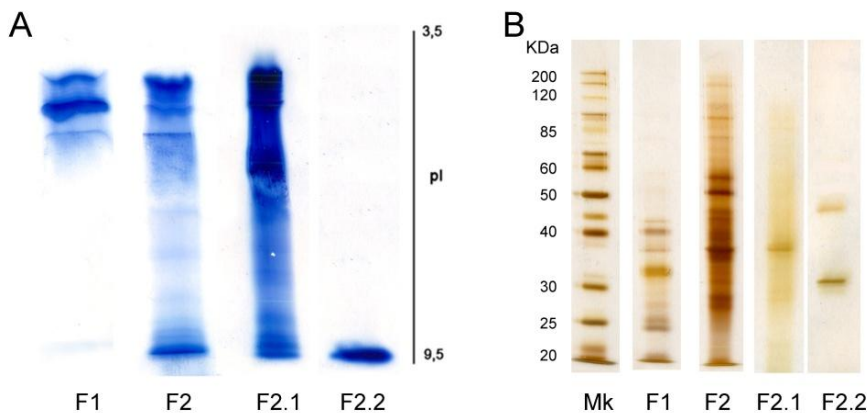


Figura 29. Isoelectroenfoque de las fracciones extraídas tras la cromatografía hidrofóbica y tras el intercambio iónico sobre SP Sefarosa™ Fast Flow del extracto F2 de *P. patens* después de teñir con 4MN y H₂O₂ (A). Análisis mediante SDS-PAGE de las mismas fracciones, después de teñir con nitrato de plata (B). Mk: Marcador de peso molecular.

El análisis electroforético de las fracciones obtenidas tras la cromatografía de intercambio iónico mostró que la fracción F2.1 contenía una

gran cantidad de isoenzimas tanto ácidas como básicas. Sin embargo, en la F2.2 aparecía una única peroxidasa de carácter fuertemente básico, denominándose a partir de ahora como PpPrx. El patrón proteico se determinó mediante SDS-PAGE (Fig. 29B), comprobando que PpPrx contenía únicamente dos proteínas, una de aproximadamente 30 kDa y otra de 45 kDa aproximadamente.

Tabla 7. Purificación de la peroxidasa PpPrx. La actividad peroxidasa ha sido medida con TMB como sustrato. AE: actividad específica.

	Actividad peroxidasa (nkat)	AE (nkat mg ⁻¹ proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	217441	442,46	1	100
Precipitación 95% (NH₄)₂SO₄	698	27,81	0,06	0,32
Cromatografía Fenil-Sefarosa	483	266,45	0,60	0,22
Cromatografía SP Sefarosa	218	23643,98	53,44	0,10

La tabla de purificación de PpPrx indica un aumento notable en la actividad específica a lo largo del proceso de purificación, consiguiéndose con este protocolo un factor de purificación elevado (Tabla 7).

II.III. Identificación de las proteínas de PpPrx por MALDI-TOF MS/MS

Debido a que en el SDS-PAGE de PpPrx (Fig. 29B) aparecían dos bandas de proteínas con diferente peso molecular (30 y 45 kDa), ambas bandas se digirieron con tripsina y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, obteniéndose la huella peptídica de cada una (Fig. 30, 31).

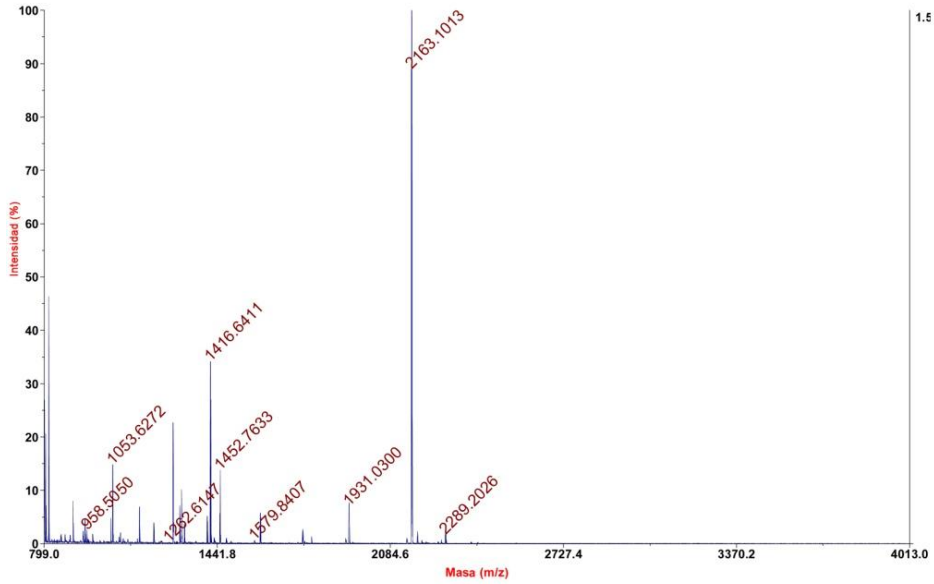


Figura 30. Huella peptídica obtenida de los fragmentos trípticos de la proteína de 30 kDa.

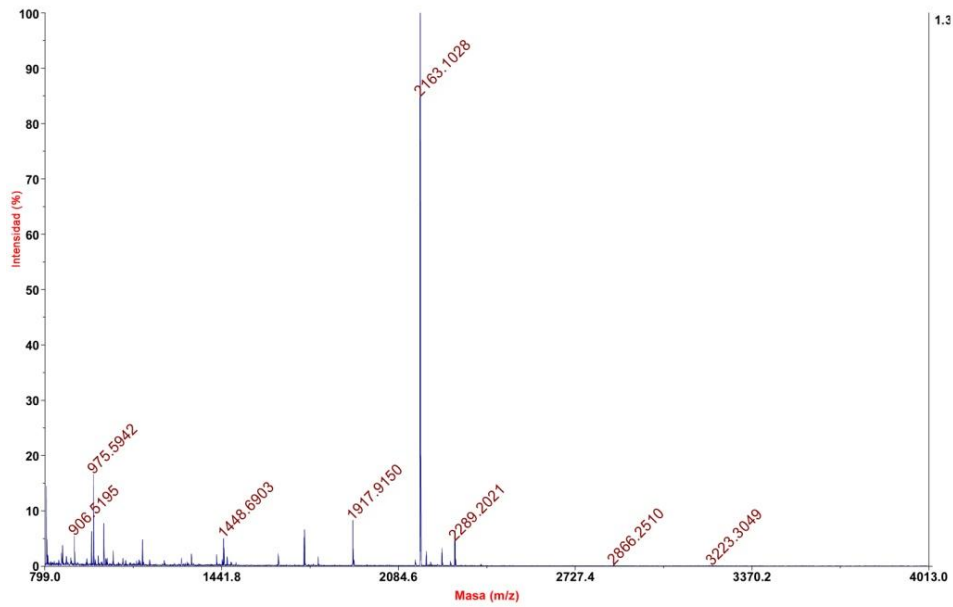


Figura 31. Huella peptídica obtenida de los fragmentos trípticos de la proteína de 45 kDa.

Las masas obtenidas se compararon con la base de datos Mascot, revelando que la proteína con un peso molecular de 36510 Da, se corresponde con una peroxidasa de clase III de *P. patens* implicada en la respuesta frente al estrés oxidativo (número de acceso: A9TSH6). Además, esta peroxidasa presenta una región de secreción semejante a la de la peroxidasa de rábano picante y tiene homología con una peroxidasa implicada en la formación de lignina en *Picea abies* (Q4W2V4). Koutaniemi *et al.* (2005) caracterizaron esta enzima, demostrando su capacidad para oxidar el alcohol coniferílico, un sustrato precursor de las unidades guayacilo. Además, mediante cinética enzimática se ha determinado que esta peroxidasa de *P. abies* homóloga a la de *P. patens* presenta una K_M de 23,2 μM para el alcohol coniferílico y una eficacia catalítica de 99,0 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Koutaniemi *et al.*, 2005). Estos datos apoyan el hecho de que esta enzima posee una alta afinidad por el sustrato y es eficiente en la oxidación del mismo. Un análisis de la secuencia de la peroxidasa de *P. abies* muestra la presencia de los determinantes típicos de las peroxidosas siringilo, por lo que podría estar también implicada en la síntesis de este tipo de ligninas (Koutaniemi *et al.*, 2005).

La otra proteína que aparece en el SDS-PAGE, se corresponde con una lipasa con un peso molecular de 46144 Da. Por este motivo PpPrx se considera como una peroxidasa vegetal de clase III purificada.

Para determinar el punto isoeléctrico teórico de PpPrx se utilizó la herramienta Compute pI/Mw. El análisis de la secuencia de la peroxidasa muestra un pI de 8,04. No obstante el pI teórico no tiene en cuenta el grupo hemo ni los dos iones calcio, por lo que hay que sumarle dos puntos más. Así, tras realizar las correcciones debidas (Welinder *et al.*, 2002), el punto isoeléctrico de esta enzima sería de 10,04. Las peroxidosas básicas se han relacionado en muchas ocasiones con la lignificación en otras especies (Holm *et al.*, 2003; Gabaldón *et al.*, 2005; Koutaniemi *et al.*, 2005), por lo que resulta interesante el hecho de haber purificado esta peroxidasa de carácter básico y con gran homología con otras peroxidosas implicadas en la lignificación.

II.IV. Dependencia del pH

El pH es crítico para la estabilidad del grupo hemo presente en las peroxidasas, ya que con valores de pH demasiado bajos o demasiado altos se puede ver alterado el sitio activo de la enzima e impedir la unión del grupo hemo (Adams, 1997). Para comprobar la dependencia de pH de PpPrx se realizaron medidas de actividad peroxidasa variando el pH del tampón de 4,0 a 9,0 en la mezcla de reacción (Fig. 32).

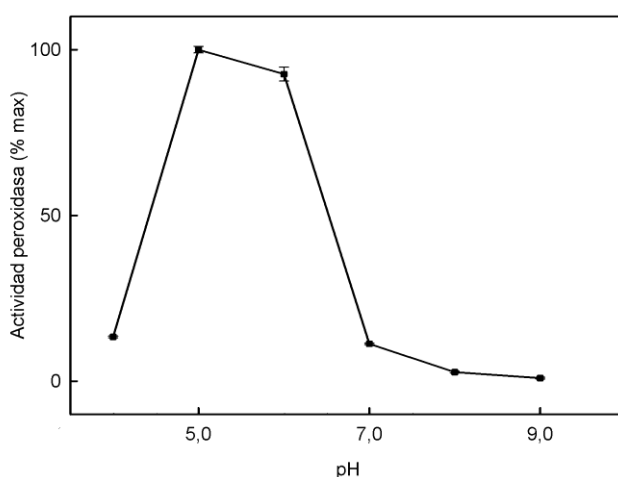


Figura 32. Medida de actividad peroxidasa de PpPrx frente a diversos valores de pH del tampón. Los resultados obtenidos son una media de tres experimentos independientes con la desviación estándar.

Esta enzima muestra un máximo de actividad a pH 5,0, disminuyendo ligeramente hasta 6,0. Finalmente, por encima de pH 6,0 la actividad enzimática desciende de forma notoria. Estos resultados coinciden con los de otras peroxidasas purificadas, en las que se determinó que el pH óptimo de las mismas se encontraba en la región de 4,5 a 6,5 (de Marco *et al.*, 1999; Mika y Lüthje, 2003; Sergio *et al.*, 2009; Cardinali *et al.*, 2011).

II.V. Especificidad de sustrato

La actividad enzimática de la peroxidasa purificada de *P. patens* (PpPrx) se midió con ácido ascórbico, NADH, ácido indolacético (AIA), ácido ferúlico y los alcoholes coniferílico y sinapílico. Los sustratos seleccionados permiten valorar la posible función de esta enzima dependiendo de la actividad enzimática que presenta con cada uno de ellos.

Tabla 8. Actividades específicas (nkat μg^{-1} proteína) de PpPrx de *P. patens* en presencia de diferentes sustratos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con la desviación estándar. N.d: no detectado.

Sustrato	Actividad específica (nkat μg^{-1} proteína)
Ácido ascórbico	n.d
NADH	n.d
AIA	0,01 \pm 0,00
Ácido ferúlico	0,53 \pm 0,07
Alcohol coniferílico	1,46 \pm 0,13
Alcohol sinapílico	0,08 \pm 0,01

Los resultados de la tabla 8 muestran que la peroxidasa purificada es capaz de oxidar todos los sustratos a excepción del NADH y el ácido ascórbico, lo que indica que es una peroxidasa de secreción de clase III (de Marco *et al.*, 1999). Esta enzima es poco eficiente para oxidar el AIA y el ácido sinapílico, presentando su máxima actividad frente al alcohol coniferílico (1,46 \pm 0,13 nkat μg^{-1} proteína) y al ácido ferúlico (0,53 \pm 0,07 nkat μg^{-1} proteína), lo que parece indicar que esta enzima podría estar relacionada con el desarrollo de la pared celular.

Todo esto señala a PpPrx como una peroxidasa con capacidad para oxidar a los alcoholes precursores de la síntesis de unidades guayacilo y siringilo de las ligninas.

II.VI. Caracterización cinética

Los sustratos empleados para determinar las constantes cinéticas fueron los alcoholes coniferílico y sinapílico. Como ya se ha mencionado previamente, *P. patens* no presenta ligninas sin embargo se ha demostrado que tiene la capacidad de oxidar a los sustratos precursores de las unidades G y S (Tabla 8), además de presentar gran homología con una peroxidasa de *P. abies* implicada en la lignificación de esta especie. Debido a esto, se hace necesario estudiar cómo se comporta esta enzima frente a diferentes concentraciones de cada uno de estos sustratos.

A partir de las determinaciones de velocidad inicial (V_0) llevadas a cabo utilizando cinco concentraciones de cada sustrato se estimaron la K_M y la V_{max} , valores que nos permitieron evaluar la eficiencia cinética de la enzima purificada (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de K_M , K_{cat} y K_{cat}/K_M de la peroxidasa purificada PpPrx de *P. patens* para los alcoholes coniferílico y sinapílico.

Sustrato	K_M (μM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} s^{-1}$)
Alcohol coniferílico	16,7	3940,0	235,80
Alcohol sinapílico	20,8	281,0	13,50

Los valores de la K_M aparente de esta enzima fueron similares para ambos alcoholes, 16,7 μM para el coniferílico y el 20,8 μM para el sinapílico. Estos valores son similares a los encontrados en otras especies que sí lignifican (Koutaniemi *et al.*, 2005) e indican que esta peroxidasa presenta una gran afinidad por ambos sustratos. La eficacia catalítica calculada a partir de la K_{cat} y K_M muestra que el mejor sustrato para la peroxidasa PpPrx es el alcohol coniferílico (235,80 $\mu M^{-1} s^{-1}$), siendo 17 veces mayor su eficiencia que para el alcohol sinapílico (13,50 $\mu M^{-1} s^{-1}$).

Si bien la oxidación del alcohol coniferílico puede conducir a la formación de otras macromoléculas diferentes de las ligninas, el alcohol sinapílico únicamente se incorpora en el polímero de lignina (Lewis y Davin,

2000). La capacidad que presenta esta peroxidasa purificada de oxidar el alcohol sinapílico con una afinidad similar a la del alcohol coniferílico en una planta que no presenta ligninas en la pared celular, indica que la aparición de enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de las ligninas precedió a la aparición de las mismas. Estos resultados vienen apoyados por la presencia en el genoma de *P. patens* de genes que codifican para todas las enzimas participantes en la ruta biosintética de las ligninas, a excepción de la F5H (Xu *et al.*, 2009). Ya que el estudio de Xu *et al.* (2009) se basa en la búsqueda de genes homólogos a los de *A. thaliana*, no se puede descartar que *P. patens* tenga genes que pudiesen codificar para alguna enzima capaz de dar lugar al alcohol sinapílico. Teniendo en cuenta que tanto la F5H descrita en angiospermas como la SmF5H de *Selaginella* son citocromos P450 y que éstos catalizan numerosas reacciones en el metabolismo primario y secundario (C4H y C3'H en el metabolismo fenilpropanoide), no sería descabellado pensar que alguna de estas enzimas fuese capaz de sintetizar alcohol sinapílico en determinadas circunstancias. La presencia de compuestos fenólicos similares a ligninas en una planta no vascular, junto con la presencia de verdaderas ligninas en algas y otras plantas no vasculares, así como la alta afinidad que la peroxidasa purificada de *P. patens* muestra hacia el alcohol sinapílico demuestra la elevada complejidad de la evolución de las rutas biosintéticas que condujeron a la aparición de plantas vasculares.

II.VII. Efecto del estrés en suspensiones líquidas de *P. patens*

P. patens presenta una gran capacidad de protección frente a diversos factores de estrés, tanto bióticos como abióticos (Kroemer *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2012). Con el fin de comprobar cómo afectan distintos tratamientos a las plantas de *P. patens*, se trataron cultivos líquidos de esta especie con diversos compuestos. Estos tratamientos se agruparon en tres clases diferentes, los que activan la cascada de señalización del ABA (ácido abscísico, cloruro sódico y manitol), el que activa la respuesta de defensa frente al ataque de patógenos (ácido salicílico) y el que activa el estrés por especies reactivas de oxígeno (peróxido de hidrógeno).

Para comprobar el efecto de los tratamientos sobre las plantas de *P. patens* se analizaron los siguientes parámetros: la actividad peroxidasa, el patrón proteico y la biosíntesis de fenoles. Además se determinó el pH del medio de cultivo.

II.VII.I. Tratamientos que activan la señalización del ABA

Los tratamientos con ABA, cloruro sódico y manitol tienen respuestas relacionadas, ya que el ABA es una señal producida en el estrés por sequía originado por el cloruro sódico y el manitol (Kim *et al.*, 2001).

El ABA es una fitohormona vegetal que media en el desencadenamiento de respuestas de las plantas a condiciones ambientales adversas. Una acumulación de ABA ocasiona el cierre de los estomas, lo que limita la pérdida de agua a través de la transpiración de las hojas disminuyendo así los requerimientos hídricos de la planta (Kim *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 2005). Koorneef *et al.* (1998) estudiaron mutantes de *A. thaliana*, que eran deficientes en ABA, los cuales mostraban síntomas de marchitez frente a condiciones de estrés, por lo que el ABA representa un paso clave en la señalización, que viene dado por el elemento sensible al ABA (ABRE; elementos de respuesta al ABA) (Kaur y Gupta, 2005). Por otra parte, no todas las respuestas al estrés parecen estar mediadas por el ABA; en *A. thaliana* diversos genes son inducidos por el frío y la sequía en los mutantes deficientes de ABA o insensibles a él (Kizis *et al.*, 2001). De manera similar a *A. thaliana*, ambas vías dependiente e independiente de ABA están presentes en *P. patens* (Fig. 33) (Minami *et al.*, 2005; Knight *et al.*, 1995).

Dentro de los elementos que median la respuesta a ABA se han descrito elementos tipo MYB y MYC asociados al gen *rd2* y el DREB1 (proteína de respuesta a la deshidratación) (Iwasaki *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 1997). Igualmente se han caracterizado factores de transcripción independientes de ABA como DREB2A asociado al gen *rd29a*. Varios de estos factores de transcripción se han sobreexpresado en plantas transgénicas y han permitido mejorar la respuestas de las plantas al estrés hídrico (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

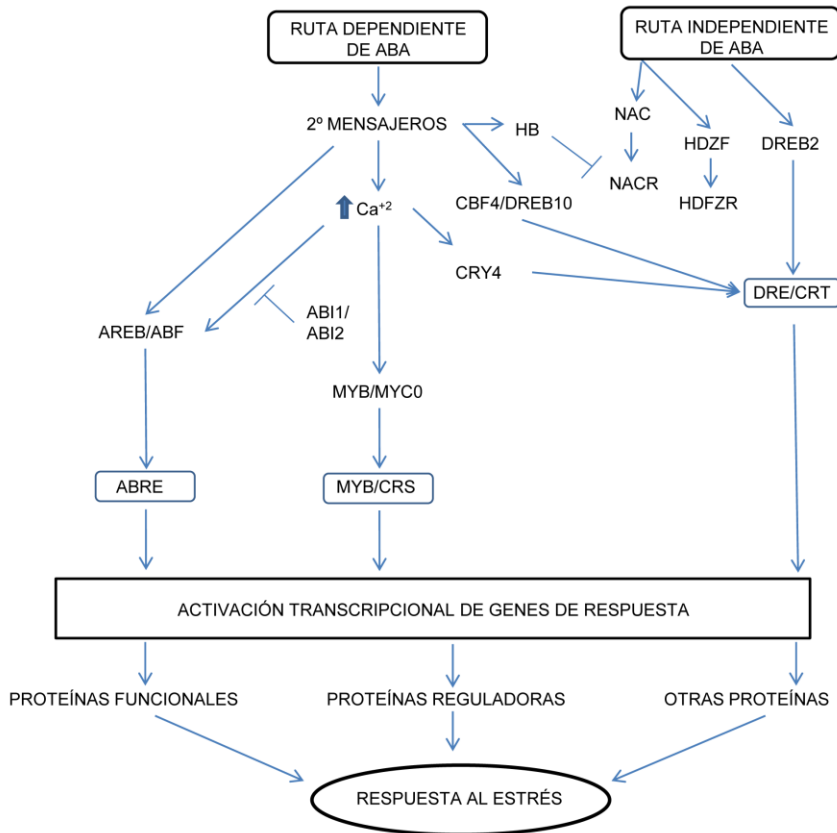


Figura 33. Ruta de señalización del ABA frente a un estrés abiótico. El ABA produce una ruta de señalización donde los segundos mensajeros provocan la activación de genes de defensa.

La mayoría de las especies vegetales no pueden soportar altas concentraciones de sales, las cuales causan desequilibrio de iones y estrés osmótico. El estrés salino conduce a una reducción en la fotosíntesis, la aparición de fotoinhibición, el estrés oxidativo y la interrupción de los canales de potasio. Este tipo de estrés, que imita al estrés por deshidratación también activa la ruta de señalización por ABA, elevando su concentración. Este incremento de los niveles de ABA provoca el cierre estomático y se inhibe la fijación del CO_2 , incrementando la formación de las especies reactivas de oxígeno (El-baky *et al.*, 2003) (Fig. 34).

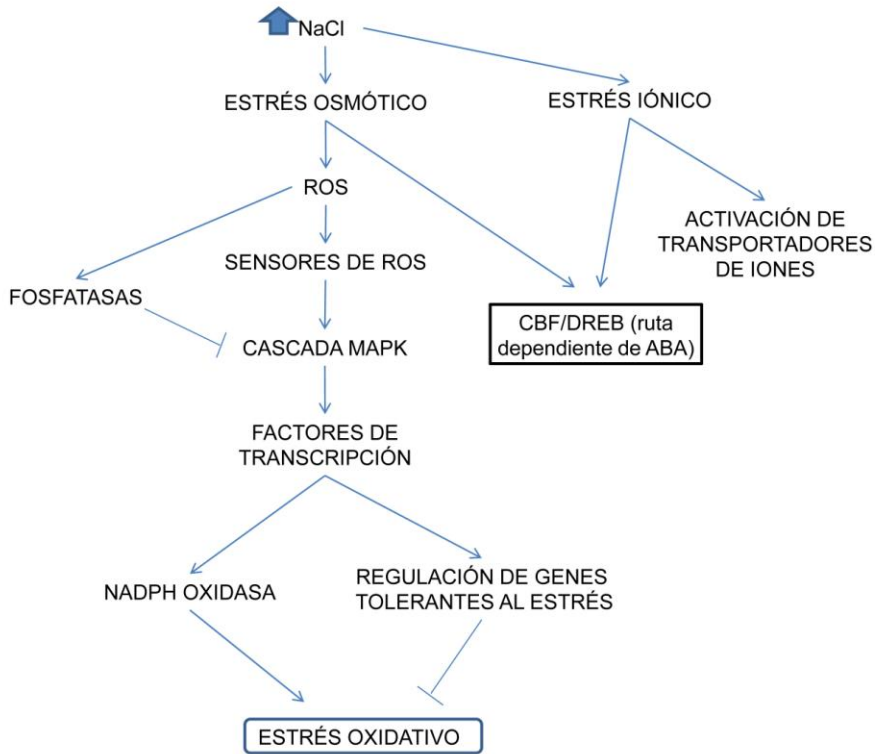


Figura 34. Mecanismo de acción del estrés inducido por cloruro sódico, estrés osmótico que provoca la acumulación de especies reactivas de oxígeno y el estrés iónico. Ambos estreses confluyen en la activación de la ruta dependiente de ABA.

Otro tipo de estrés osmótico es el estrés por exceso de azúcares, en este caso el manitol, cuya aplicación exógena produce respuestas debidas a la deshidratación y la activación de la ruta dependiente de ABA.

II.VII.I.I. Análisis de la variación de pH

Para comprobar los cambios de pH que se producen en el medio de cultivo con este tipo de tratamientos se recogieron muestras de los mismos en distintos tiempos (Fig. 35).

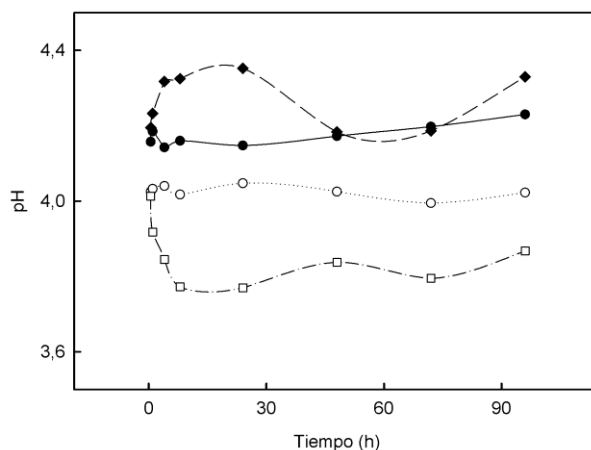


Figura 35. Valores de pH del medio de cultivo de *P. patens* tras los tratamientos que activan la ruta de señalización del ABA. C: control (●), ABA: ácido abscísico (○), NaCl (□) y manitol (◆).

La adición exógena de ABA no produce una variación del pH con respecto al control, mientras que el tratamiento con NaCl provoca una disminución del pH que es máxima a las 4 horas tras el tratamiento. A diferencia del ABA y el NaCl, el manitol muestra un patrón de alcalinización y acidificación del medio, elevando su pH hasta las 24 horas para luego volver a valores de pH inicial y alcalinizarse otra vez a las 96 horas.

La disminución del pH se ha visto que forma parte de una respuesta rápida frente al estrés y puede estar inducido por la activación de diferentes bombas de transporte (Benito y Rodríguez-Navarro, 2003; Fan *et al.*, 2004). De hecho, una de las consecuencias de la acumulación de ABA es la apertura de canales de Ca^{+2} y la despolarización temporal de la membrana, lo que promueve la apertura de canales de Cl^- que a su vez inhibe los canales de K^+ de entrada y las bombas de protones-ATPasas; de modo que el flujo neto de cargas negativas produce una despolarización de la membrana e incremento del pH citosólico, lo que se traduce en una acidificación del medio de cultivo (Fan *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en el tratamiento con manitol parecen indicar una mayor dificultad de la planta para regular el efecto de este tratamiento (Yamaguchi-Shinosaki y Shinosaki, 2006).

II.VII.I.II. Efecto sobre la actividad peroxidasa

Uno de los mecanismos de aclimatación que presentan las plantas y que les permite adaptarse a ambientes adversos es la producción de proteínas funcionales y reguladoras (Yamaguchi-Shinosaki y Shinosaki, 2006). Entre los grupos de proteínas que se sobreexpresan durante el estrés por sequía se encuentran las enzimas antioxidantes, como las peroxidasa, que detoxifican radicales libres, como el H_2O_2 , que se genera debido a un aumento en la tasa de fotorreducción en los cloroplastos, lo que hace que la planta pueda sobrevivir en condiciones desfavorables con menos requerimientos (Apel y Hirt, 2004).

Las muestras de *P. patens* recogidas a diferentes tiempos de cada uno de los tratamientos se utilizaron para determinar la actividad peroxidasa (Fig. 36).

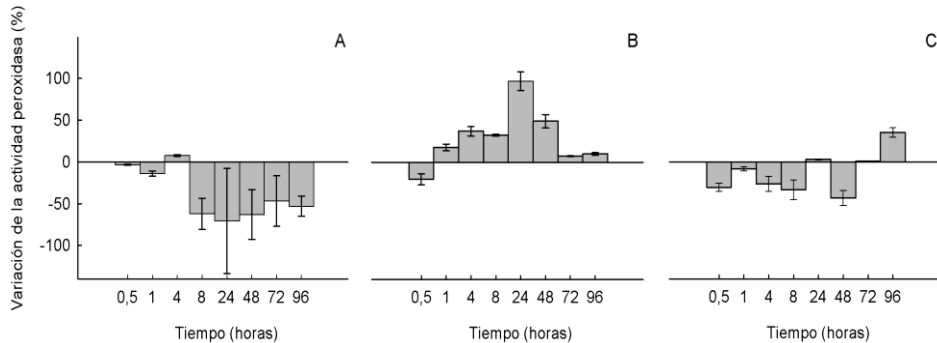


Figura 36. Variación de la actividad peroxidasa de los diversos tiempos escogidos para los tratamientos con ácido abscísico (A), cloruro sódico (B) y manitol (C) relativizados frente a su control. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, las barras de error representan la desviación estándar.

La adición de ABA a concentración $10 \mu M$ en nuestros ensayos sólo produce un aumento de la actividad peroxidasa en relación al control 4 horas después del tratamiento, mientras que a todos los demás tiempos se observa una disminución. Sin embargo, la misma concentración de ABA en el arroz causa un aumento de la actividad peroxidasa al mismo tiempo que disminuye el crecimiento de las raíces de 1 a 24 horas (Lin y Kao, 2001a; Tsai y Kao,

2004). Esta diferencia en la respuesta al ABA podría deberse a que la concentración de ABA es insuficiente para causar la respuesta esperada.

Por otra parte la adición de NaCl a una concentración 250 mM produce la inducción de la actividad peroxidasa a partir de 1 hora tras el tratamiento, presentando su pico máximo a las 24 horas. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos en tratamientos a concentraciones de 50 a 300 mM en especies como el arroz y *Centaurea ragusina*, en los que se incrementa la actividad peroxidasa al mismo tiempo que se inhibe el crecimiento de la raíz, tanto a tiempos que abarcan de 1 a 12 horas como de días (Lin y Kao, 2001b; Radic *et al.*, 2006).

En los tratamientos de las suspensiones de *P. patens* con concentraciones de manitol de 250 mM se produce una disminución de la actividad peroxidasa, aunque se ve un incremento de la misma en los cultivos a las 96 horas. El manitol es un compuesto que causa un daño oxidativo, sobre todo en las membranas lipídicas, induciendo la oxidación de fenoles y la actividad peroxidasa (Radic *et al.*, 2006). Se ha visto que el contenido de malonaldehído, un indicador del daño oxidativo, se incrementa en los callos de algodón tratados con concentraciones de 50 y 110 mM de manitol tras 14 días, disminuyendo en concentraciones de 170 y 230 mM. Asimismo, la actividad superóxido dismutasa (SOD) decrece tras el tratamiento con concentraciones de manitol de 50 y 230 mM (Daud *et al.*, 2013). Así, al igual que en los callos de algodón, en las plantas de *P. patens* podría estar produciéndose una disminución de la SOD, que está relacionada con la inducción tardía de la actividad peroxidasa, ya que una disminución de SOD que cataliza la reacción de reducción de los radicales libres a O₂ y H₂O₂, provoca una disminución en los niveles de peróxido, el cual es un sustrato limitante para las peroxidases.

II.VII.I.III. Efecto sobre el patrón proteico

A la vista de que los tratamientos responsables de la activación de las rutas de ABA causaron cambios en la actividad peroxidasa, principalmente en el caso del tratamiento con cloruro sódico, y para averiguar si además se producían cambios en el patrón proteico o en el patrón de peroxidases, se

analizaron las diferentes muestras mediante SDS-PAGE (Fig. 37) e isoelectroenfoque (Fig. 38) a 4 y 24 horas tras el tratamiento.

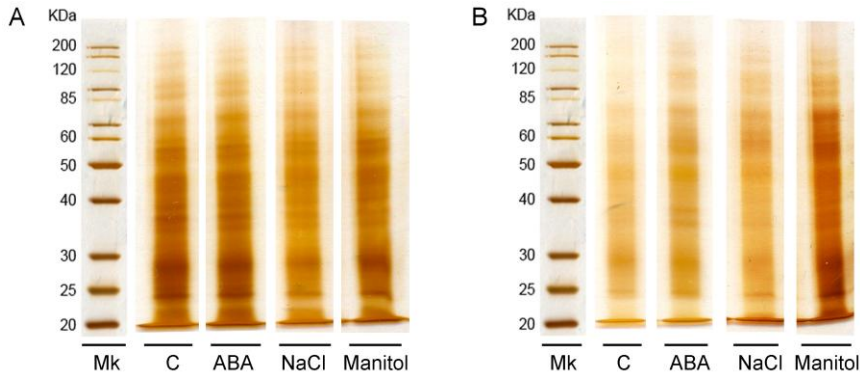


Figura 37. Análisis mediante SDS-PAGE de la fracción proteica de plantas de *P. patens* recogidas tras los tratamientos a 4 (A) y 24 (B) horas, después de teñir con nitrato de plata. Mk: Marcador de peso molecular. C: control, ABA: ácido abscísico.

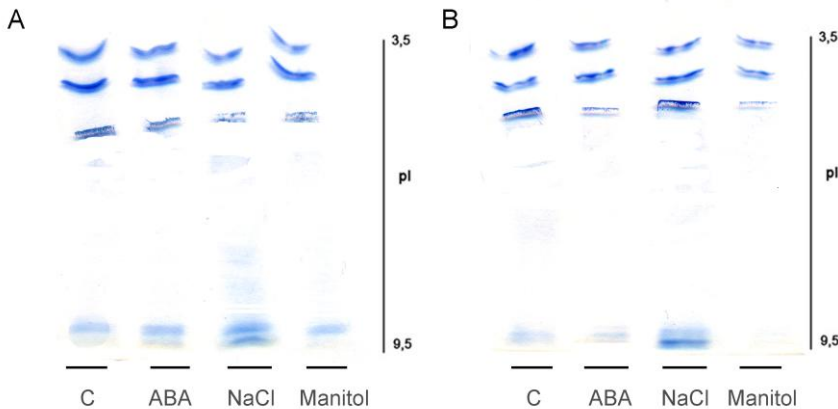


Figura 38. Isoelectroenfoque de la fracción proteica de plantas de *P. patens* recogidas tras los tratamientos a 4 (A) y 24 (B) horas, después de teñir con 4MN y H_2O_2 . C: control, ABA: ácido abscísico.

Los resultados del SDS-PAGE no muestran ningún cambio significativo en el patrón proteico a las 4 y a las 24 horas después de los tratamientos (Fig. 37A, B), mientras que los resultados obtenidos mediante IEF muestran variaciones tanto en el patrón de isoenzimas de peroxidases como en la intensidad de las mismas.

A las 4 horas tras el tratamiento (Fig. 38A) no parece haber cambios en las peroxidasas de *P. patens*, a excepción de la inducción de peroxidasas básicas en el tratamiento con NaCl. Estos datos coinciden con las medidas de actividad peroxidasa, en las que se veía que solo el tratamiento con cloruro sódico producía un aumento de la misma. Por lo tanto, este incremento de la actividad peroxidasa podría atribuirse a la inducción de las peroxidasas básicas de *P. patens*.

A las 24 horas (Fig. 38B) podemos observar una ligera inhibición de las peroxidasas básicas en el tratamiento con el ABA, lo cual concuerda con las medidas de actividad peroxidasa (Fig. 36). Por su parte en el tratamiento con manitol esta inhibición de las peroxidasas básicas es más acusada, además de verse acompañadas por una disminución de las isoenzimas ácidas. Esto coincide con que tanto a 4 como a 24 horas se produce una inhibición de la actividad, la cual se ve inducida a las 96 horas. Por último, el tratamiento con cloruro sódico causa una inducción de las peroxidasas básicas, sobre todo de la más básica que, a juzgar por su pI, se corresponde con la peroxidasa previamente purificada (PpPrx), lo que parece indicar que esta peroxidasa está implicada en la respuesta frente a este tipo de estrés hídrico. Estos datos coinciden con los de actividad peroxidasa, en los que la mayor inducción tiene lugar a las 24 horas.

II.VII.I.IV. Efecto sobre la biosíntesis de fenoles

Todas las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios, uno de cuyos grupos más importantes es el de los compuestos fenólicos. La cantidad de compuestos fenólicos presentes en un tejido vegetal puede variar en función de diferentes factores ambientales y condiciones de estrés. La acumulación de compuestos fenólicos tales como los compuestos semejantes a las ligninas parece estar relacionada con la defensa de las plantas frente al estrés (Fig. 39) (Díaz *et al.*, 2001; Grace y Logan, 2000; Michalak, 2006).

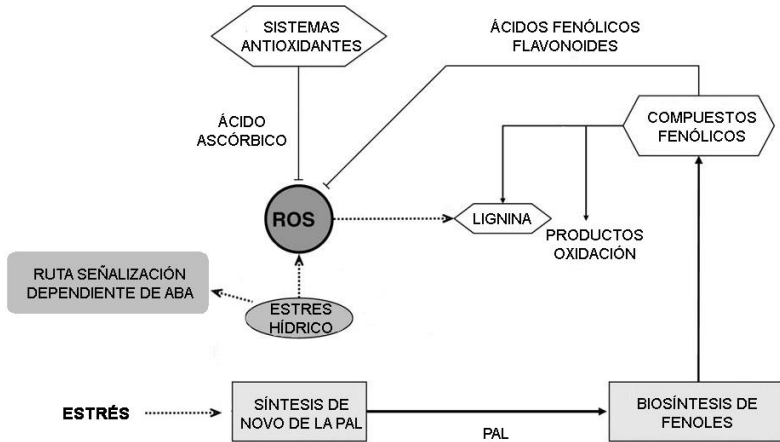


Figura 39. Mecanismos de la biosíntesis de los compuestos fenólicos y su relación con la defensa. Modificado de Reyes *et al.* 2007.

Tal y como se ha dicho previamente, *P. patens* contiene compuestos de naturaleza fenólica semejantes a las ligninas, que parecen estar implicados en la protección de la planta. Para comprobar el efecto de los tratamientos en la biosíntesis de fenoles se realizaron medidas de los compuestos fenólicos a las 96 horas después del tratamiento (Fig. 40).

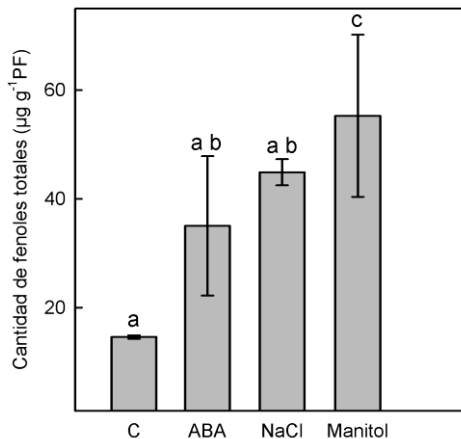


Figura 40. Efecto de los diversos tratamientos en las plantas de *P. patens* en la acumulación de compuestos fenólicos a 96 horas tras el tratamiento. C: control, ABA: ácido abscísico, PF: peso fresco. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan $\alpha=0,05$).

En todos los tratamientos probados que inducen la respuesta al ABA se observa un incremento significativo de los compuestos fenólicos, llegando a ser entre 2 y 3 veces superior con respecto al control en los tratamientos con ABA y NaCl, e incrementando hasta casi 4 veces en el tratamiento con manitol (Fig. 40).

Se ha descrito que en diferentes especies el estrés por deshidratación provoca la acumulación de fenoles a nivel de la epidermis para disminuir la salida de agua (Zapprometov, 1989; Kefeli y Kalevitch, 2003; Bhattacharya *et al.*, 2010). De hecho, el tratamiento con ABA estimula la acumulación de compuestos fenólicos, así como la actividad de la PAL en la fresa (Jiang y Joyce, 2003; Quiroga *et al.*, 2012). Este efecto de los compuestos fenólicos frente a la deshidratación se ha comprobado mediante el tratamiento con manitol en los rizoides de *Polypodium vulgare* (Bagniewska-Zadworna *et al.*, 2008). Otro efecto secundario de estos tratamientos es la producción de ROS, por lo que las plantas han desarrollado mecanismos antioxidantes para protegerse de ellos, siendo uno de estos mecanismos la producción de los fenoles (Zheng y Wang, 2001; Proteggente *et al.*, 2002), observándose una correlación entre la actividad antioxidante y la cantidad de compuestos fenólicos (Verzelloni *et al.*, 2007).

Así el incremento de compuestos fenólicos obtenido en todos los tratamientos aplicados podría ser debido al papel antioxidante que tienen estas sustancias.

II.VII.II. Tratamiento que activa la respuesta de defensa frente al ataque de patógenos

El ácido salicílico (SA) es un compuesto fenólico que participa en muchas funciones metabólicas de las plantas, tales como el cierre de estomas, la expresión de genes relacionados con la senescencia, la respuesta a estrés abiótico o la señalización celular (Durner *et al.*, 1997; Vlot *et al.*, 2009; Loake y Grant, 2007). Se ha visto que la adición exógena de SA induce la resistencia sistémica adquirida (Audenaert *et al.*, 2002; Rivas y Plasencia, 2011). Además

este compuesto participa en la eliminación de manera eficiente de los compuestos oxidativos (Kawano y Muto, 2000).

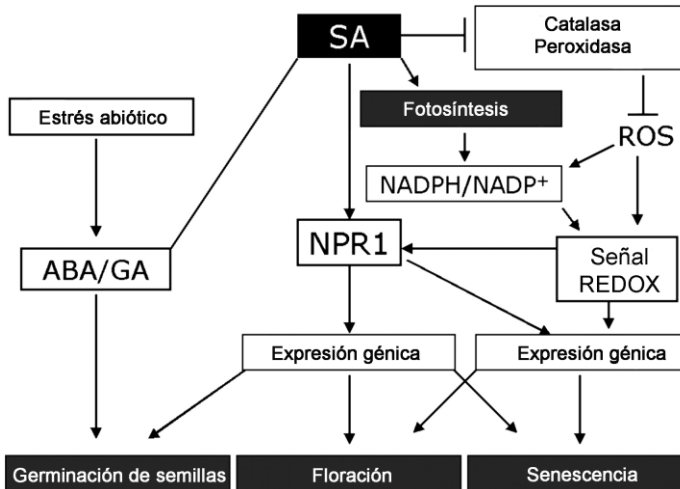


Figura 41. Modelo descriptivo de la función del ácido salicílico en el crecimiento y el desarrollo de las plantas. El SA es percibido por NPR1, el transductor clave de señalización del SA en respuestas de defensa de las plantas. Además, el SA es un regulador clave del estado redox de la planta mediante la inhibición de la actividad catalasa y peroxidasa, y por lo tanto la modulación de ROS. Modificado de Rivas y Plasencia (2011).

Se ha propuesto un modo de acción para el SA basándose en el hallazgo de que éste se une e inhibe a las enzimas catalasa y peroxidasa (Fig. 41) (Chen *et al.*, 1993; Loake y Grant, 2007). El H₂O₂ podría tener una actividad antibiótica contra patógenos, y alguno de sus intermediarios podría formar parte de la ruta de señalización para la expresión de genes de defensa (Durner *et al.*, 1997; Loake y Grant, 2007). Esta hipótesis fue cuestionada por experimentos en donde se demostró que la inducción de proteínas relacionadas con la defensa, tales como las PR1 no se originaba como resultado de la producción del H₂O₂ derivado de la inhibición de la catalasa por SA, sino del SA directamente y que el H₂O₂ en altos niveles puede inducir la producción de SA (Bi *et al.*, 1995; Leon *et al.*, 1995; Neuenschwander *et al.*, 1995; Summermatter *et al.*, 1995; Loake y Grant, 2007).

II.VII.II.I. Análisis de la variación de pH

Tal como se hizo con los tratamientos anteriores se midió el pH del medio para observar las variaciones que producía el tratamiento con ácido salicílico con respecto al control (Fig. 42).

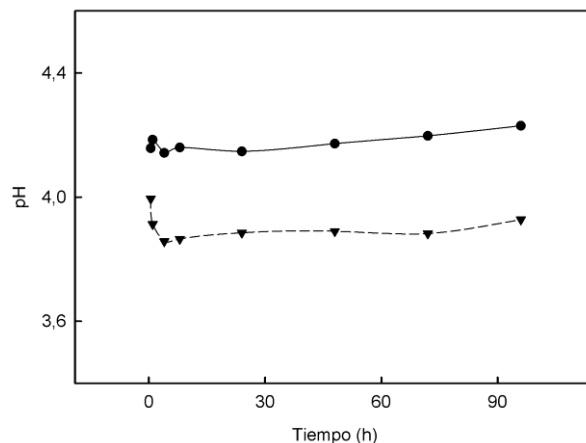


Figura 42. Valores de pH del medio de cultivo de *P. patens* tras el tratamiento con ácido salicílico. C: control (●), SA: ácido salicílico (▼).

El tratamiento con SA provoca una disminución inmediata del pH del medio, que se regula a partir de las 4 horas y se mantiene paralelo al control, que puede ser debido a que la adición de un ácido al medio de cultivo provoca una rápida disminución del pH del medio. Este efecto ha sido relacionado con la activación de rutas de señalización para la expresión de genes de defensa debido al incremento de H_2O_2 y otras ROS, así como al aumento de calcio citosólico (Durner *et al.*, 1997; Kawano y Muto, 2000; Loake y Grant, 2007).

II.VII.II.II. Efecto sobre la actividad peroxidasa

Las muestras recogidas se emplearon para determinar el efecto del SA sobre la actividad peroxidasa (Fig. 43).

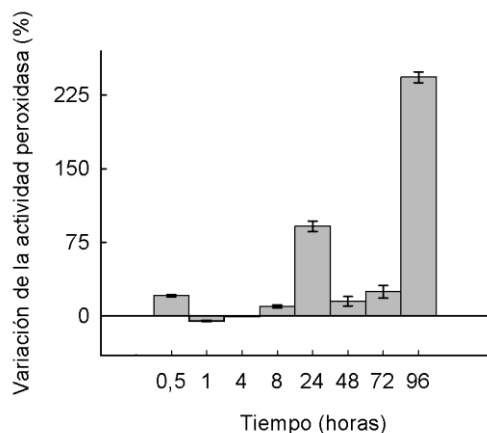


Figura 43. Variación de la actividad peroxidasa de los diversos tiempos escogidos para el tratamiento con ácido salicílico (SA) relativizados frente a su control. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, las barras de error representan la desviación estándar.

El tratamiento con SA se ha realizado con una concentración 1 mM, observándose un aumento de la actividad peroxidasa media hora después del tratamiento, para luego bajar y volver a aumentar a partir de 8 horas, presentando dos picos máximos, a 24 y 96 horas.

Tratamientos en hojas de *Vigna unguiculata*, han determinado que a las 9 días tras el tratamiento la actividad peroxidasa se mantiene estable a concentraciones de SA 1 mM, y aumenta en concentraciones de 5 y 10 mM (Fernandes *et al.*, 2006). El SA puede interferir tanto positiva como negativamente en las vías metabólicas mediadas por las peroxidases. La inhibición de las peroxidases por el SA es probablemente debido al hecho de que éste puede actuar como un inhibidor de la cinética de la enzima, ya que, por una parte, el SA es un sustrato del componente II (Kawano *et al.*, 2002a) y, por otro lado, el SA favorece la inactivación irreversible de la enzima (Kawano *et al.*, 2002b), bloqueando todas las reacciones mediadas por peroxidases que consumen H_2O_2 .

En nuestros tratamientos a diferencia de los de Fernandes *et al.* (2006), parece producirse una inducción de la vía metabólica de las peroxidases, motivo por el cual podría estar incrementándose su actividad.

II.VII.II.III. Efecto sobre el patrón proteico

Para comprobar el efecto del tratamiento del ácido salicílico sobre la composición proteica y las peroxididasas se hizo un análisis mediante SDS-PAGE (Fig. 44) y un isoelectroenfoque (Fig. 45) a las 4 y 24 horas del tratamiento.

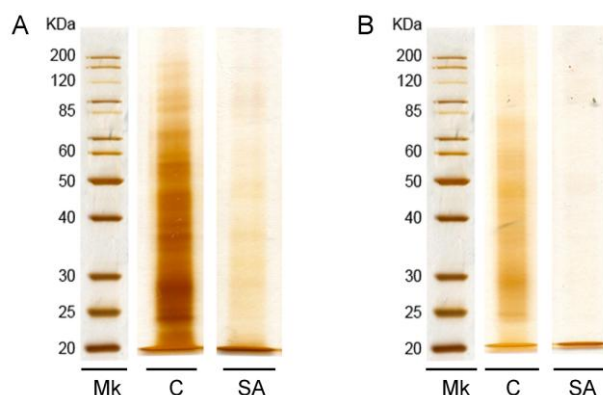


Figura 44. Análisis mediante SDS-PAGE del patrón proteico de las plantas de *P. patens* recogidas tras el tratamiento a 4 (A) y 24 (B) horas, después de teñir con nitrato de plata. Mk: Marcador de peso molecular. C: control, SA: ácido salicílico.

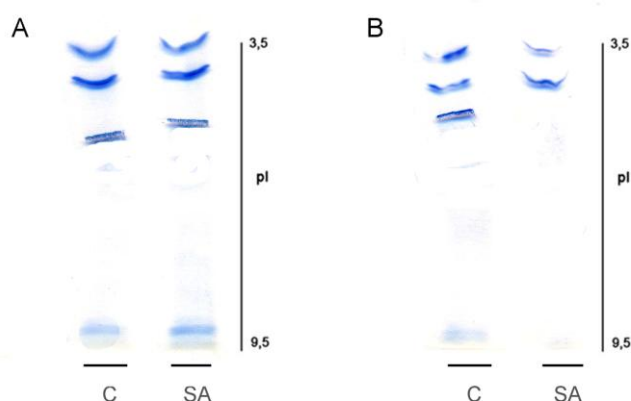


Figura 45. Isoelectroenfoque de la fracción proteica de las plantas de *P. patens* recogidas tras los tratamientos a 4 (A) y 24 (B) horas, después de teñir con 4MN y H_2O_2 . C: control, SA: ácido salicílico.

Los resultados del SDS-PAGE muestran una disminución significativa de las proteínas tanto a 4 como a 24 horas (Fig. 44A, B), lo que podría deberse a que las plantas estén entrando en una fase senescente por la adición del ácido salicílico al medio y las proteínas estén comenzando a sufrir una degradación. Además, mientras que a las 4 horas no parece haber un cambio en el patrón isoelectroforético (Fig. 45A), el IEF muestra variaciones tanto en la cantidad de isoenzimas de peroxidasas como en la intensidad de las mismas a las 24 horas tras el tratamiento, observándose una inhibición no solo de las peroxidasas básicas, sino también de dos de las peroxidasas ácidas (Fig. 45B).

Estas plantas han entrado en fase senescente en la que se produce un aumento de la actividad peroxidasa (Fig. 43), al igual que ocurre en hojas de *Ramonda serbica* (Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2006). Además, la degradación de las proteínas se ha visto que puede ser debido a la alta intensidad catabólica de las reacciones oxidativas y la activación de proteasas específicas (Thomson *et al.*, 1987).

II.VII.II.IV. Efecto sobre la biosíntesis de fenoles

El efecto del ácido salicílico en la biosíntesis de compuestos fenólicos en las plantas se midió a las 96 horas tras el tratamiento (Fig. 46).

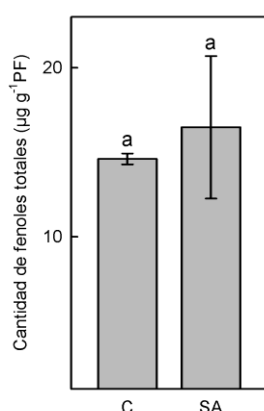


Figura 46. Efecto de los diversos tratamientos en las plantas de *P. patens* en la acumulación de compuestos fenólicos a 96 horas tras la elicitación. C: control, SA: ácido salicílico, PF: peso fresco. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan $\alpha=0,05$).

A pesar de que un efecto secundario de este tipo de estrés suele ser la producción de compuestos oxidativos, no parece haber un incremento significativo de los compuestos fenólicos presentes en las plantas a las 96 horas tras este tratamiento.

Ponce de León *et al.* (2012) exponen que el endurecimiento de las paredes producidas por la biosíntesis de compuestos fenólicos tiene lugar cuando la planta detecta las señales causadas por un patógeno e induce la biosíntesis de ácido salicílico. En plantas de *Phoenix dactylifera* tratadas con concentraciones de SA de 50 μ M, 200 μ M y 1 mM se estudió la relación entre el SA y los compuestos fenólicos. El tratamiento con la concentración más baja indujo la formación de compuestos fenólicos, mientras que los otros tratamientos inhibieron la formación de estos compuestos (Dihazi *et al.*, 2003), mostrando un patrón distinto de actuación entre las concentraciones bajas de SA y las altas.

En nuestro caso no hay diferencias significativas entre las plantas control y las tratadas con SA a pesar de haber empleado una concentración 1 mM tal como la usada en plantas de *Phoenix dactylifera*. Esto puede ser debido a que las plantas han entrado en su etapa senescente antes de que se produjera un cambio en la cantidad de compuestos fenólicos.

II.VII.III. Tratamiento que activa la ruta de estrés por ROS

El peróxido de hidrógeno es considerado una molécula señal y un regulador de la expresión de algunos genes en las células. Cuando se acumula en las plantas, activa factores de transcripción que regulan diferentes procesos fisiológicos, inhibe el crecimiento y desarrollo vegetal, y estimula los mecanismos de defensa a estreses bióticos y abióticos (Fig. 47) (Yu *et al.*, 2002, 2003; Pnueli *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2005).

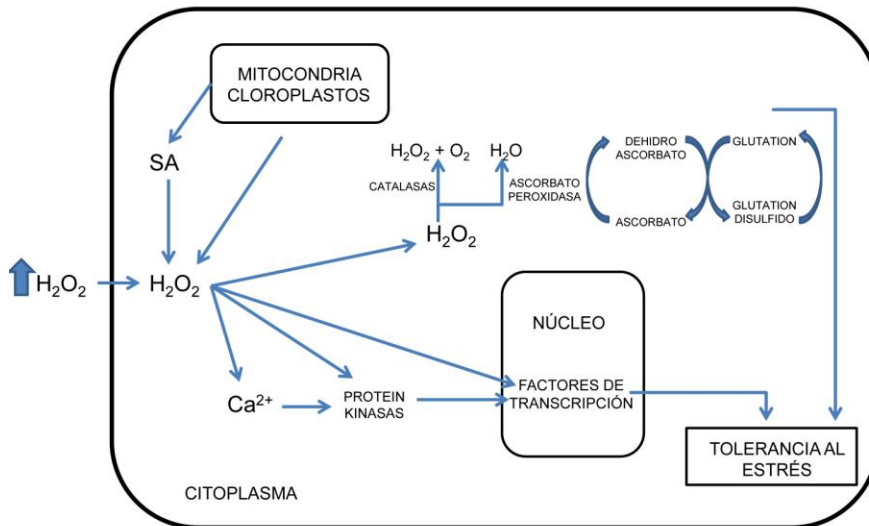


Figura 47. Modelo de la cascada de señalización inducida por el peróxido de hidrógeno.

Por las características de este compuesto altamente reactivo, de vida media corta y potente óxido-reductor, existen pocos trabajos donde se experimente su aplicación exógena en plantas, aunque algunos de ellos han revelado que elicitaciones de H_2O_2 inhibieron el crecimiento de la planta y aumentaron el contenido de almidón y lignina sin presentar síntomas tóxicos (Foyer *et al.*, 1997; López-Delgado *et al.*, 1998a, b, 2005; Vannini *et al.*, 2012).

Para comprobar el efecto de la adición exógena de H_2O_2 en las suspensiones se hizo un control con ácido ascórbico, que elimina el H_2O_2 por medio de la ascorbato peroxidasa (De Gara *et al.*, 2010).

II.VII.III.I. Análisis de la variación de pH

El análisis del pH se realizó tanto con el tratamiento con H_2O_2 como con su control con ácido ascórbico (Fig. 48).

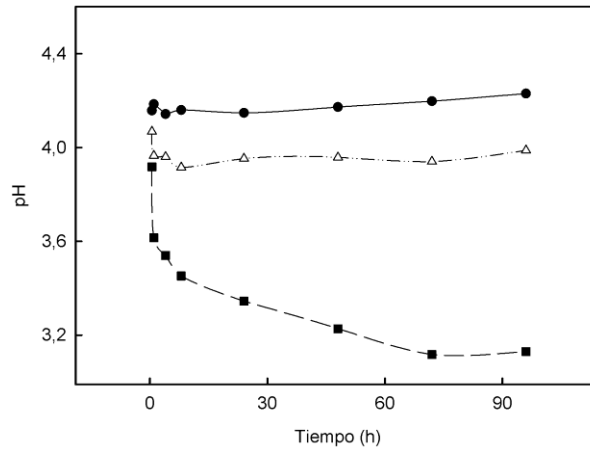


Figura 48. Valores de pH del medio de cultivo de *P. patens* tras los tratamientos que activan la ruta de estrés oxidativo. C: control (●), H₂O₂ (▲), Asc: H₂O₂ y ascórbico (■).

El tratamiento con H₂O₂ provoca una disminución del pH del medio, aunque esta disminución es rápida y se estabiliza a partir de las 4 horas. La adición de H₂O₂ y ácido ascórbico al medio provoca una rápida acidificación causada en un primer momento por la introducción de un compuesto acidificante al medio. Esta rápida disminución del pH va seguida de una acidificación gradual y constante del pH del medio.

Aunque el ácido ascórbico es el antioxidante mayoritario de las plantas (De Gara, 2004; Gallie, 2013), y ejerce su función detoxificando los ROS y manteniendo constante el pH de las plantas, también activa antiportadores y canales de protones que a su vez acidifican el medio de cultivo, lo cual podría explicar la disminución gradual en el tratamiento con ácido ascórbico (Green y Fry, 2005a, b). Se ha visto que la rápida disminución del pH tras la inducción de H₂O₂ puede ser debida a la producción de ROS, que provocan la acidificación del medio (Loake y Grant, 2007; Hung *et al.*, 2005).

II.VII.III.II. Efecto sobre la actividad peroxidasa

Las plantas de *P. patens* recogidas en cada uno de los tratamientos y tiempos se utilizaron para determinar el efecto sobre la actividad peroxidasa (Fig. 49).

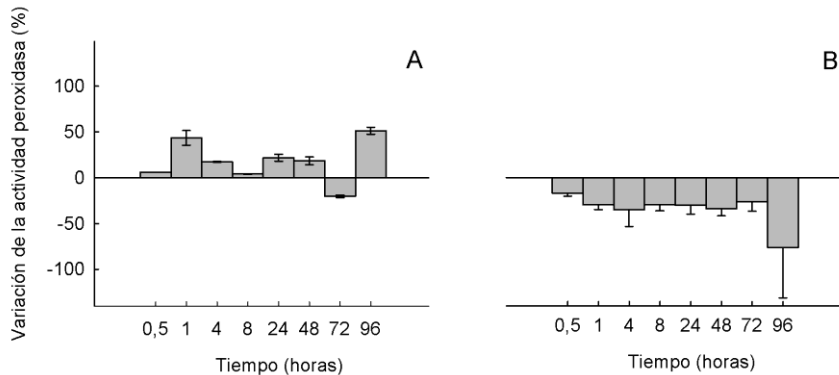


Figura 49. Variación de la actividad peroxidasa específica de los diversos tiempos escogidos para los tratamientos con H₂O₂ y H₂O₂ Asc (H₂O₂ y ácido ascórbico) relativizados frente a su control. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, las barras de error representan la desviación estándar.

El tratamiento con H₂O₂ muestra una inducción rápida a 1 hora y otra tardía a las 24 horas, tras la cual la actividad peroxidasa disminuye hasta llegar a ser menor que el control, para finalmente volver a presentar un pico de actividad a las 96 horas. Sin embargo el tratamiento con H₂O₂ y ácido ascórbico muestra una disminución de la actividad peroxidasa en las plantas de *P. patens*.

Los resultados de actividad peroxidasa obtenidos en los tratamientos de *P. patens* con H₂O₂ coinciden con trabajos previos en los que se ha observado el incremento tanto a tiempos cortos como a las 24 horas ya sea de la actividad peroxidasa como del H₂O₂, sustrato limitante de estas enzimas (De Pinto *et al.*, 2006; Ozden *et al.*, 2009). Sin embargo el incremento de la actividad peroxidasa por la adición de H₂O₂ exógeno tiende a estabilizarse a partir de los 3 días (Goud y Kachole, 2011).

La actividad peroxidasa constituye la primera línea de defensa frente a las ROS y la senescencia (Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2006). Como se ha relatado previamente, las peroxididasas juegan un papel importante en la regulación de las ROS en la célula a través de la activación y desactivación de H_2O_2 (Blokina *et al.*, 2003). Se ha visto que a concentraciones de hasta 10 mM de H_2O_2 aumenta la actividad peroxidasa (Lin y Kao, 2001), generándose radicales libres (Kawano y Muto, 2000), lo que parece coincidir con nuestros datos, en los que vemos un incremento de la actividad peroxidasa de modo general. Li *et al.* (2010) sugieren que el tratamiento con H_2O_2 previene el incremento de H_2O_2 endógeno, motivo por el cual podría no haber un gran incremento de la actividad peroxidasa tras el tratamiento. La adición exógena de una concentración 10 mM de H_2O_2 incrementa la actividad peroxidasa en las hojas de *Vitis vinifera* 6 horas tras la inducción, aumentando también la actividad SOD (Ozden *et al.*, 2009).

Para comprobar que el efecto en la actividad peroxidasa está causado por la adición de H_2O_2 se hizo un control con H_2O_2 y ácido ascórbico. El ácido ascórbico es un antioxidante que previene el daño celular producido por el estrés oxidativo neutralizando las ROS (De Gara, 2004). El resultado del tratamiento con ascórbico muestra la inhibición de la actividad peroxidasa, por lo que se podría pensar que el efecto de inducción de la actividad peroxidasa es debido al tratamiento con H_2O_2 .

II.VII.III.III. Efecto sobre el patrón proteico

Al igual que con los otros tratamientos se observó el patrón proteico y de peroxididasas a 4 y 24 horas mediante SDS-PAGE (Fig. 50) e isoelectroenfoque (Fig. 51).

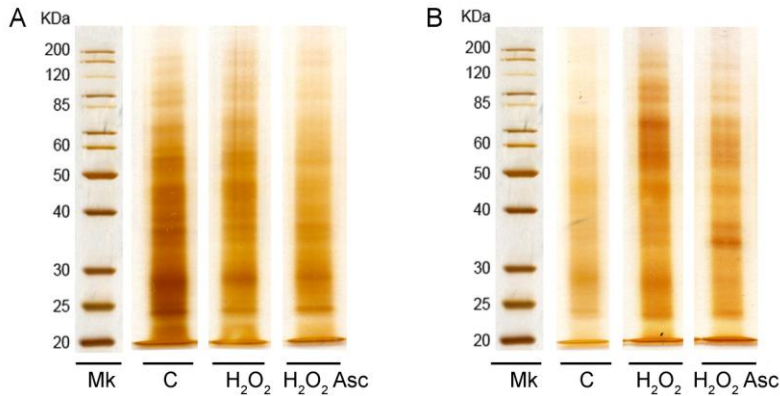


Figura 50. Análisis mediante SDS-PAGE de la fracción proteica de las plantas de *P. patens* recogidas tras los tratamientos a 4 (A) y 24 (B) horas, después de teñir con nitrato de plata. Mk: Marcador de peso molecular. C: control, H₂O₂ Asc: H₂O₂ y ascórbico.

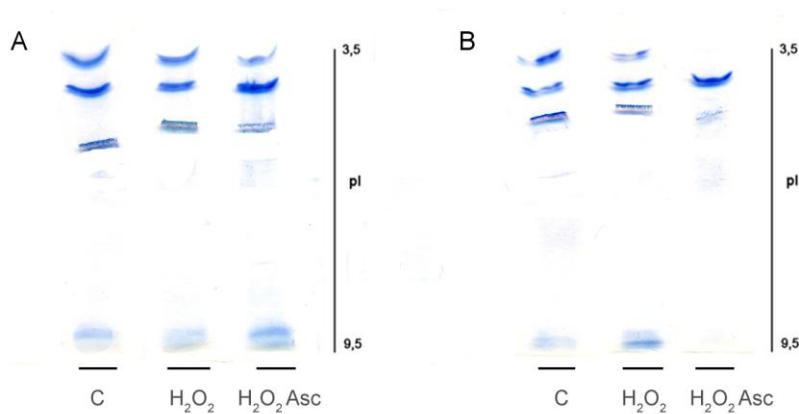


Figura 51. Isoelectroenfoque de la fracción proteica de las plantas de *P. patens* recogidas tras los tratamientos a 4 (A) y 24 (B) horas, después de teñir con 4MN y H₂O₂. C: control, H₂O₂ Asc: H₂O₂ y ascórbico.

Los resultados del SDS-PAGE no muestran un cambio aparente en el patrón proteico tanto a las 4 como a las 24 horas con respecto al control (Fig. 50A, B). Por otra parte, los resultados obtenidos mediante IEF muestran variaciones tanto en el patrón como en la intensidad de las isoenzimas de peroxidasas a las 24 horas, pudiéndose observar en el tratamiento con peróxido de hidrógeno la inducción de la peroxidasa purificada previamente (PpPrx) de punto isoeléctrico 10,04. Por otra parte, en el tratamiento con

peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico a las 24 horas hay una represión de las peroxidasa s básicas y algunas de las peroxidasa s ácidas, lo que concuerda con la disminución observada previamente de la actividad peroxidasa, esto parece indicar que el ácido ascórbico añadido está eliminando no solo el H₂O₂ exógeno, sino también el endógeno, inhibiendo al mismo tiempo a las peroxidasa s (Fig. 51A, B). Los resultados obtenidos parecen indicar que la peroxidasa PpPrx previamente purificada tiene un papel importante en la respuesta frente al estrés oxidativo.

II.VII.III.IV. Efecto sobre la biosíntesis de fenoles

Las medidas de fenoles se realizaron a las 96 horas al igual que en los otros tratamientos (Fig. 52).

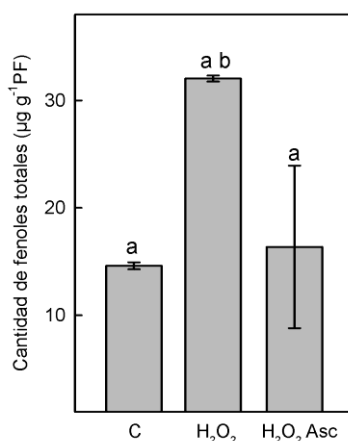


Figura 52. Efecto de los diversos tratamientos en las plantas de *P. patens* en la acumulación de compuestos fenólicos a 96 horas tras la elicitación. C: control, H₂O₂ Asc: H₂O₂ y ascórbico, PF: peso fresco. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan $\alpha=0,05$).

Los resultados muestran que en el tratamiento con H₂O₂ hay una gran inducción de los compuestos fenólicos, hecho que no se da en el tratamiento con H₂O₂ y ácido ascórbico (Fig. 52).

Al añadir H₂O₂ se produce el estallido oxidativo y un incremento de las rutas fenólicas. Los fenoles actúan como potentes inhibidores del estrés oxidativo, cooperando con las peroxidasas en la eliminación del peróxido de hidrógeno (Arencibia *et al.*, 2012; Falleh *et al.*, 2012), motivo por el cual se puede observar la inducción en las plantas de *P. patens* tanto de los compuestos fenólicos con el tratamiento con H₂O₂ (Fig. 52) como de la actividad peroxidasa (Fig. 49).

En el tratamiento con H₂O₂ y ácido ascórbico no se produce un incremento de los compuestos fenólicos. Este hecho puede ser debido bien a que el ácido ascórbico ya actúa como un potente antioxidante o porque el exceso de ácido ascórbico inhibe la formación de ROS.

II.VIII. Caracterización del secretoma radicular

II.VIII.I. Extracción proteica

P. patens es un organismo modelo en el que se han realizado diversos estudios proteómicos tanto en condiciones normales como bajo diversas condiciones de estrés (Sarnighausen *et al.*, 2004; Polyakov *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2012). Sin embargo, es notable la ausencia de estudios sobre el proteoma en diversos puntos del desarrollo de esta planta.

Las raíces excretan proteínas que sirven a las plantas para comunicarse (Bais *et al.*, 2004; Badri *et al.*, 2012), y por lo tanto las proteínas varían según el momento del desarrollo. Así un estudio de estas proteínas podría acercarnos más al entendimiento de cómo se comunican y desarrollan estas plantas. Con el fin de identificar las proteínas excretadas por los rizoides de *P. patens* se realizaron cultivos líquidos de esta especie y se estudió el proteoma en dos etapas del desarrollo: la de crecimiento activo y la de senescencia, a 7 y 28 días desde el inicio del cultivo, respectivamente.

Para la obtención de muestras proteicas de alta calidad se suelen usar diversos métodos, como cloroformo-acetona, Mg/Nodidet P-40, ácido tricloroacético (TCA), fenol, Tris-base-acetona, TCA-acetona y TCA-fenol-

cloroformo (Maldonado *et al.*, 2008; Xiao-liang *et al.*, 2010). En todos estos estudios los mejores resultados se obtuvieron mediante la precipitación con TCA-acetona, tanto en la calidad de las proteínas obtenidas como en la identificación de las mismas. Por otra parte, la precipitación con sulfato amónico no desnatura las proteínas y por lo tanto, la muestra puede ser utilizada para análisis adicionales. Por este motivo, decidimos comparar la eficacia del método de precipitación con TCA-acetona frente al de sulfato amónico en las proteínas secretadas por los rizoides de *P. patens* al medio de cultivo.

Ambos métodos de precipitación mostraron patrones de proteínas similares (Fig. 53), aunque con la precipitación con TCA-acetona se ha conseguido obtener una mayor cantidad de proteínas a juzgar por la cuantificación mediante Bradford (1976) (Tabla 10).

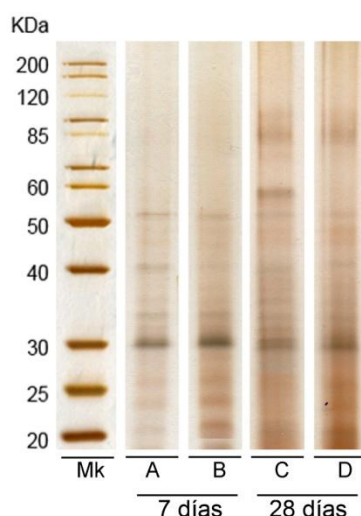


Figura 53. Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas secretadas por los rizoides de *P. patens* y precipitadas con sulfato amónico (A, C) y TCA-acetona (B, D), después de teñir con nitrato de plata. Mk: Marcador de peso molecular.

Tabla 10. Cuantificación proteica (μg totales) de las muestras obtenidas tras la precipitación de las proteínas del extracto radicular de *P. patens* de cultivos líquidos de 7 y 28 días con dos métodos diferentes, la precipitación con sulfato amónico y la precipitación con TCA-acetona.

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	TCA-acetona
7 días	3	17
28 días	4	24

Debido a que el método con TCA-acetona es más eficaz en la precipitación proteica y a que permite una mejor detección tanto de las proteínas de bajo peso molecular como las de alto peso molecular, ya que para extraerlas no se emplean sales que pueden interferir en la identificación de las proteínas, se eligió el método de TCA-acetona para continuar con los experimentos posteriores.

II.VIII.II. Identificación de las proteínas

Las proteínas secretadas por los rizoides se precipitaron con TCA-acetona y se analizaron mediante espectrometría de masas nanoLC-MALDI TOF/TOF. De entre todos los péptidos obtenidos, tan sólo se valoraron aquellos que obtuvieron un porcentaje de confianza superior al 95%. Se lograron identificar un total de 47 proteínas en los cultivos de 7 días y 67 proteínas en los cultivos de 28 días, 21 de las cuales son compartidas en ambas etapas de desarrollo (Fig. 54).

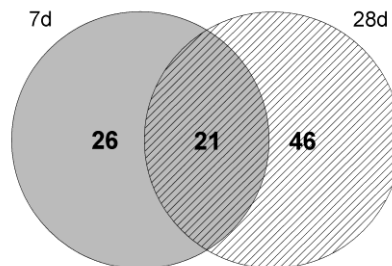


Figura 54. Diagrama de Venn en el que se muestra la cantidad de proteínas secretadas por los rizoides de *P. patens* en los cultivos de 7 y 28 días, así como la cantidad de proteínas semejantes en ambas fases del desarrollo.

Las proteínas identificadas se agruparon de acuerdo con su función en 6 categorías en las que se incluyen estrés/defensa, modificación de la pared celular, senescencia, energía, regulación y transducción de señal (Tablas 11-16).

II.VIII.II.I. Estrés / Defensa

El estudio del secretoma radicular de *P. patens* ha permitido identificar diversas proteínas que están implicadas en el mecanismo de estrés y defensa de las plantas (Tabla 11).

En la defensa de las plantas participan un gran número de proteínas, algunas que se expresan de manera constitutiva y otras que son expresadas bajo condiciones adversas. Un ejemplo de expresión constitutiva es la Gnk2-1, una proteína antifúngica que se encuentra en las semillas del endospermo de *Ginkgo biloba* (Miyakawa *et al.*, 2009) y tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Otras proteínas implicadas en la inhibición del crecimiento de hongos y plantas son las toxinas asesinas (Brown, 2011). Ambas proteínas se localizan en la secreciones radiculares de los cultivos a 7 días y están implicadas en la inhibición del crecimiento de las raíces (Miyakawa *et al.*, 2009; Brown, 2011), lo que promueve que la energía metabólica de la planta sea empleada para prevenir la infección por hongos, además de servir para inhibir el crecimiento de las raíces de otras plantas eliminando así la competencia.

Las quitinasas aparecen en los cultivos tanto de 7 como de 28 días y participan en la defensa frente a patógenos, ya que en algunas quitinasas se ha demostrado que poseen actividad inhibitoria frente al crecimiento de hongos (Broekaert *et al.*, 1986; Mauch *et al.*, 1988). Del mismo modo, se ha demostrado que al ser sobreexpresadas en plantas transgénicas aumentan la resistencia de éstas frente a hongos patógenos (Jach *et al.*, 1995; Grisson *et al.*, 1996). Así, las quitinasas están actualmente clasificadas en las familias PR3, PR4, PR8 y PR11 de proteínas de defensa (Van Loon *et al.*, 1999). También se ha descrito la expresión constitutiva de quitinasas en numerosos cultivos *in vitro*, debido al proceso de agitación inherente al propio cultivo (Sabater-Jara *et al.*, 2010; Belchí-Navarro *et al.*, 2013). Otras proteínas localizadas en el secretoma radicular de *P. patens* son las peroxidasas de clase III, que participan en actividades redox como la eliminación de H₂O₂, la oxidación de reductores tóxicos y la respuesta al estrés ambiental, como el ataque de patógenos y el estrés oxidativo (Welinder *et al.*, 2002; Marjamaa *et al.*, 2009). Una de las peroxidasas de clase III se ha identificado como una

peroxidasa de *G. biloba* que participa en la biosíntesis de las ligninas (Novo-Uzal *et al.*, 2009a). La síntesis de ligninas se puede producir de manera constitutiva durante el desarrollo de la planta o bien ser inducida por factores bióticos o abióticos como un mecanismo de defensa (Marjamaa *et al.*, 2009)

Las cupinas y las proteínas semejantes a germinas aparecen en todas las fases del desarrollo existiendo en todos los órganos asociadas con la matriz extracelular (Schlesier *et al.*, 2004). Las proteínas semejantes a germinas son glicoproteínas de la matriz extracelular normalmente ancladas a ésta mediante uniones iónicas débiles. La mayoría de ellas existen como oligómeros muy estables y llevan unido un ión metálico, normalmente manganeso. Las proteínas de la superfamilia de las cupinas presentan un amplio rango de actividades enzimáticas, aunque parece que la principal función de las semejantes a germinas es como la de la superóxido dismutasa, que protege a las plantas del estrés oxidativo (Khuri *et al.*, 2001). Por lo tanto, al igual que las peroxidases y lacasas parecen participar en el mecanismo redox de las plantas (Collins *et al.*, 2010; Gucciardo *et al.*, 2006). El hecho de que estas proteínas participen en la defensa frente al estrés oxidativo podría explicar porque éstas aparecen principalmente en los cultivos de 28 días (Gucciardo *et al.*, 2006).

La familia de los citocromos P450 está involucrada en el metabolismo oxidante de compuestos endógenos tales como fenilpropanoides y glucósidos cianogénicos, los cuales tienen una función en los procesos moleculares de interacción planta-patógeno y en la defensa a nivel bioquímico contra herbívoros, respectivamente (Durst, 1991). Adicionalmente, los citocromos P450 participan activamente en la biosíntesis de fitorreguladores de crecimiento como giberelinas, ácido abscísico y brasinoesteroides (Krochko *et al.*, 1998; Fujioka y Yokota, 2003, Saito *et al.*, 2004). Esto indica la importancia del citocromo P450 en el proceso evolutivo de la tolerancia de las plantas vasculares a factores bióticos y abióticos. Otras proteínas como la lipasa, las taumatinas y la HSP90 son proteínas que se expresan en respuesta a una infección por patógenos, pero también se han encontrado expresadas de manera constitutiva en suspensiones celulares de diferentes especies, lo que sugiere que su expresión está relacionada con el estrés inherente a la agitación (Novo-Uzal *et al.*, 2009b; Briceño *et al.*, 2012).

Tabla 11. Proteínas identificadas mediante nanoLC-MALDI-TOF/TOF en el secretoma radicular de *P. patens* implicadas en la respuesta frente al estrés y la defensa.

PM (kDa)	Nº de acceso	Proteína	Especie	Péptidos 7 días	Péptidos 28 días
14,49	C3VHZ7	Proteína antimicrobial Gnk2-1	<i>Ginkgo biloba</i>	IFSICNNAIGAR VQLVDCFIQYEQR	
13,17	A9TFY6	Toxinas asesinas Kp4	<i>P. patens</i>	GLAHFIPEHGCR GNEASILVSYINNIDPNR	GNEASILVSYINNIDPNR
33,83	A9TSW7	Quitinasa clase I	<i>P. patens</i>	SFPQFGTTGDTDTR	
31,09	E1C9S1	Quitinasa clase I	<i>P. patens</i>	AAASAYPTFGNEGSVDDQKR EIAAFFGNVQESGGLK NADFYTFR	AAASAYPTFGNEGSVDDQK AAASAYPTFGNEGSVDDQKR ETNPTEIYCDTTNTQYPCAAGK IINGAKECGLVNDER NADFYTFR EIAAFFGNVQESGGLK
41,75	A9SUH2	Lipasa	<i>P. patens</i>	AYGAALQQALEDLR	AYGAALQQALEDLR LYPPYSTSFTFR
35,22	A9TFB4	Peroxidasa clase III	<i>P. patens</i>	AFQQDNGVAPGLVR AMQAMAGIGVLTGNEGQIR CGKYDVESIIYNEIAK FDSQYFQNIIDRK GCDASLLLDIPNSEK GKGWTVYGGGR GLLTSDQSLLDDSR GLSADDLVALSGSHTIGIAHCIFVNPR MAFHDCFVR NSGNFFNSEFGR	AFQQDNGVAPGLVR AGIGVLTGNEGQIR AMQAMAGIGVLTGNEGQIR ASAFNAIDAAK CGKYDVESIIYNEIAK GCDASLLLDIPNSEK GKGWTVYGGGR GLLTSDQSLLDDSR MAFHDCFVR NSGNFFNSEFGR NSYNLRPNYYSGK

Tabla 11. Proteínas identificadas mediante nanoLC-MALDI-TOF/TOF en el secretoma radicular de *P. patens* implicadas en la respuesta frente al estrés y la defensa. Continuación.

PM (kDa)	Nº de acceso	Proteína	Especie	Péptidos 7 días	Péptidos 28 días
				NSYNLRPNYYSGK SQCPADSVTTNPPVGAPINLDR TATINLGLR TAVESVCPGVVSCADVLQYATR VSPTKFDSQYFQNIIDRK YDVESIIYNEIAK AFQQDNGVAPGLVR AMQAMAGIGVLTGNEGQIR CGKYDVESIIYNEIAK FDSQYFQNIIDRK	PPNNLPVPTMTPTQMIFLAGK SQCPADSVTTNPPVGAPINLDR TATINLGLR TAVESVCPGVVSCADVLQYATR YDVESIIYNEIAK GWTVYGGR GCDASLLLDIPNSEKTATINLGLR AFQQDNGVAPGLVR AMQAMAGIGVLTGNEGQIR ASAFNAIDAAK CGKYDVESIIYNEIAK GCDASLLLDIPNSEK GKGWTVYGGR GLLTSQSLDDSR MAFHDCFVR NSGNFFNSEFGR NSYNLRPNYYSGK SQCPADSVTTNPPVGAPINLDR TAVESVCPGVVSCADVLQYATR
32,49	P85317	Peroxidasa clase III	<i>Ginkgo biloba</i>	DSVVEIGQLADTVAPVR	
18,47	Q8L7M6	Haloperoxidasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MDEVMTAADVGSLLGGNR	
21,81	A9SN74	Proteína semejante a germina	<i>P. patens</i>	ELQAGDVVFVPR ITSDSFPVLTGLGVSSAQIK YLPGGINPPHHPR	
21,78	Q5KSC2	Proteína semejante a germina	<i>P. patens</i>		ELQAGDVVFVPR
23,32	A9SDF7	Proteína semejante a germina	<i>P. patens</i>		VNDFLFR

Tabla 11. Proteínas identificadas mediante nanoLC-MALDI-TOF/TOF en el secretoma radicular de *P. patens* implicadas en la respuesta frente al estrés y la defensa. Continuación.

PM (kDa)	Nº de acceso	Proteína	Especie	Péptidos 7 días	Péptidos 28 días
23,83	A9SJU3	Cupina	<i>P. patens</i>		GDITVFPR TPAIAQLSLNSQAPGR VTSNDFTFR
70,64	B9R7T9	Citocromo P450	<i>Ricinus communis</i>		RFIDSLKALR
56,65	C5X2B0	Citocromo P450	<i>Sorghum bicolor</i>		LVQGALGPDALR
22,24	A9RSU4	Taumatina	<i>P. patens</i>	NVDGPGLNPTDGTR	NVDGPGLNPTDGTR
26,03	A9SI63	Taumatina	<i>P. patens</i>		QDAVTASASWGGR
0,97	P85917	Chaperona (HSP90)	<i>Pseudotsuga menziesii</i>		ELLSEINR
59,17	B9RZ10	Glucosa metanol oxidoreductasa	<i>Ricinus communis</i>		VEGFRDASGAKLHMR
13,91	A9TSM8	Proteína de transferencia lipídica	<i>P. patens</i>	YSDAYVNNALHVPAR	
11,28	A9SY69	Proteína de transferencia lipídica	<i>P. patens</i>	LNYIHNYNCK QCPAVNSYISCR SIGVNFELASKLPQECR	
40,92	E1C9U2	Proteína de transferencia lipídica	<i>P. patens</i>	ALPSDCGITVDYAR	

II.VIII.II.II. Modificación de la pared celular

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). En el secretoma radicular de *P. patens* podemos encontrar varias proteínas implicadas en estas funciones (Tabla 12).

Las pectinesterasas están involucradas en la extensión de la pared celular y participan en importantes procesos fisiológicos, incluido el desarrollo de raíces, por lo que estas proteínas se encuentran en la pared celular (Wen *et al.*, 1999). Otras proteínas implicadas en la extensión son las glicosil hidrolasas, que participan en la regulación de la expansión de la pared celular y la modificación durante el desarrollo, procesos que también son regulados por las proteínas integrales de membrana (Henrissat *et al.*, 2001; Jamet *et al.*, 2006). Todas estas proteínas se encontraron en los cultivos a los 7 días, por lo que parecen involucradas en las primeras etapas del desarrollo de las plantas interviniendo en la extensión de la pared.

Las glicosiltransferasas transfieren polisacáridos y glicanos en las glicoproteínas, por lo que la importancia de estas proteínas radica en que son fundamentales en la realización de funciones vitales de reserva energética, reconocimiento celular y señalización, y sobre todo en la función estructural (Coutinho *et al.*, 2003).

Las proteínas Sec23, las proteínas semejantes a lipocalinas y los transportadores mitocondriales están implicados en el transporte de moléculas pequeñas, la mayoría hacia la membrana plasmática para formarla y reforzarla (Lederkremer *et al.*, 2001).

Las lacasas son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las oxidasas de cobre azul. Varias evidencias sugieren su implicación en la biosíntesis de ligninas, basándose en la capacidad de oxidar los precursores de la lignina y en su localización en las paredes celulares del xilema (Davin *et al.*, 1992; Dean y Eriksson, 1994; McDougall y Morrison, 1996), sin embargo *P.*

patens es una planta que no posee la capacidad de lignificar, por lo que su papel más obvio sería el de participar en el control del estado redox de la pared celular a través del control de los niveles de ácido ascórbico (Ros Barceló *et al.*, 2006), ya que estas enzimas presentan una gran actividad ascorbato oxidasa. Así, las lacasas están implicadas en la modificación de la pared celular (Dean y Eriksson 1994; McDougall y Morrison 1996; Ranocha *et al.*, 2002). De hecho, se ha comprobado que la inhibición de las lacasas provoca alteraciones en el metabolismo fenólico y la estructura de la pared celular en el álamo (Ranocha *et al.*, 2002).

Las proteínas semejantes a proteínas dirigentes al igual que las lacasas están relacionadas con la producción de compuestos fenólicos, como los semejantes a ligninas, los cuales participan en la regulación del estrés oxidativo (Ralph *et al.*, 2006).

Al crecer, las plantas de *P. patens* unen varios tallos para formar una estructura circular que ayuda a proteger a la planta de diversos factores ambientales; para este proceso las plantas requieren de proteínas que regulan las señales de adhesión tales como las proteínas semejantes a fasciclinas. La aparición de estas proteínas sólo se da en los cultivos de 7 días, cuando las plantas están empezando a formar sus estructuras características (Jun y Xiaoming, 2012).

Tabla 12. Proteínas identificadas mediante nanoLC-MALDI-TOF/TOF en el secretoma radicular de *P. patens* implicadas en la modificación de la pared celular.

PM (kDa)	Nº de acceso	Proteína	Especie	Péptidos 7 días	Péptidos 28 días
40,78	A9TIA5	Pectinesterasa	<i>P. patens</i>	TGFVFDQCTIR VLSAAQAKPFLDYGFIDAK	
32,08	A9U3Y7	Glicosil hidrolasa familia 16	<i>P. patens</i>	QTLAQQFTPWTENAR	QTLAQQFTPWTENAR
37,71	A9RSU6	Glicosil hidrolasa familia 17	<i>P. patens</i>	VADNLPSPPEVVSLLR	VADNLPSPPEVVSLLR
29,89	A9TSX2	Glicosil hidrolasa familia 18	<i>P. patens</i>	FVSVAPGYDQLAR	FVSVAPGYDQLAR
51,95	A9SP30	Glicosiltransferasa familia 13	<i>P. patens</i>	IALATPLNNVDENILKMVENVNR	
84,49	Q6ZDG9	Proteína Sec23	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp. Japonica</i>	IQGIIGPCTSLEKK	
63,31	A9SJV9	Lacasa	<i>P. patens</i>	ATMFGAFIVHPR	
13,05	A9RR04	Proteínas semejantes a dirigentes	<i>P. patens</i>		LTFYAHETR
18,92	A9TKL2	Proteínas semejantes a dirigentes	<i>P. patens</i>	ITGFGVLSTIGGLPTGGVQVTSK	ITGFGVLSTIGGLPTGGVQVTSK
25,14	A9SJW5	Proteína semejante a lipocalina	<i>P. patens</i>	SFTEQNLACITAR TLTVSFGGPVADYR YSLIEANTIR	SFTEQNLACITAR TLTVSFGGPVADYR YSLIEANTIR IIYVSGEAR
22,33	Q4A3U9	Proteína semejante a lipocalina	<i>P. patens</i>		TLTVSFGGPVADYR YSLIEANTIR
35,06	D8RMI2	Proteína de transporte mitocondrial	<i>S. moellendorffii</i>		RQMQRVQPAPASGTQEK
109,82	B9GDE6	Proteína integral de membrana	<i>Oryza sativa</i> <i>subsp. Japonica</i>		MLAETTGSTGKLLRR
24,42	E1C9N4	Proteína semejante a fasciclina	<i>P. patens</i>	LQQLAAVIEAAGLADTVR	LQQLAAVIEAAGLADTVR NNQVLTTLFLGPNYTLR

II.VIII.II.III. Senescencia

La senescencia es un proceso programado dentro del desarrollo de la planta que implica una serie de cambios enzimáticos y metabólicos que tienen lugar de forma simultánea o secuencial en los diferentes tejidos que envejecen. En el secretoma radicular de los cultivos de 28 días de *P. patens* se han localizado algunas proteínas relacionadas con la senescencia (Tabla 13).

Las peptidasas participan en los procesos de muerte celular generando la movilización y exportación masiva de carbono, nitrógeno y minerales con un eficiente reciclaje de los nutrientes (Pak y Van Doorn, 2005). Otras proteínas implicadas en este proceso son las proteasas y tiol proteasas, que rompen los enlaces peptídicos, lo que a su vez activa el proceso apoptótico y la hidrólisis de proteínas. Este proceso apoptótico es regulado por proteínas como la E4 ubiquitina, que reconoce la cadena de ubiquitinización y atrae a la proteína hacia su interior. La monoubiquitinación está relacionada con procesos de regulación, como la endocitosis, la reparación de ADN o la regulación transcripcional (Koeogl *et al.*, 1999). En muchas ocasiones cuando se detecta un error en el ADN, el ciclo celular se para, bien para poder arreglarlo, bien para entrar en apoptosis si este arreglo no es posible. Una de las proteínas implicadas en la regulación del ciclo es la RINT-1/TIP-1, que se encarga de regular el ciclo celular parándolo durante las fases S y G2/M.

Todas estas proteínas se encontraron únicamente en los cultivos de 28 días, lo cual podría estar relacionado con el inicio de la senescencia de estas plantas.

Tabla 13. Proteínas identificadas mediante nanoLC-MALDI-TOF/TOF en el secretoma radicular de *P. patens* implicadas en la senescencia.

PM (kDa)	Nº de acceso	Proteína	Especie	Péptidos 7 días	Péptidos 28 días
46,30	B9G767	Peptidasa	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>		KIVDDVTIAVEK
73,26	A9THJ0	Proteasa	<i>P. patens</i>		VEDVNLPSMVATFTR
50,19	A9TQW9	Tiol proteasa	<i>P. patens</i>		AVAGQPVSVAIEAGGR
12,68	C5XH31	Factor de rápida alcalinización	<i>Sorghum bicolor</i>		GAAGTGTGTVEECGMAR
47,54	I1KZD9	Proteína E4 ubiquitina	<i>Glycine max</i>		AGNGATALHLAAR
77,21	A9TMR3	Proteína RINT-1 /TIP-1	<i>P. patens</i>		CDQIRGFAGR
98,86	A9SL79	Proteína de reparación de errores de DNA	<i>P. patens</i>		RMKTFGEAVQALR

II.VIII.II.IV Obtención de energía

En esta categoría se incluyen diversas proteínas implicadas en la obtención energética y en el metabolismo celular del desarrollo de *P. patens* (Tabla 14).

La fosfofructoquinasa (PfkB) es una proteína implicada en el desarrollo, que se encuentra en los complejos cromosómicos transcripcionalmente activos de varias especies vegetales (Gilkerson *et al.*, 2012). Esta proteína aparece únicamente en los cultivos de 7 días, lo que podría estar relacionado con una obtención de energía fundamental en las primeras etapas de desarrollo. El desarrollo de las semillas y la adquisición de fosfatos son dos puntos importantes en el desarrollo de las plantas. Dentro de la categoría de proteínas relacionadas con la obtención energética se han encontrado varias proteínas relacionadas con estos procesos tanto a 7 como a 28 días. La fosfatasa 2C está implicada en la señalización del ABA (Sáez *et al.*, 2006) y forma parte de un mecanismo de control negativo ejercido por un inhibidor que funciona cuando se encuentra en forma fosforilada y se inactiva al ser desfosforilado por las fosfatasas, regulando así la germinación y actuando frente a diferentes tipos de estrés abiótico (González-García *et al.*, 2003; Kaida *et al.*, 2010). *P. patens* es capaz de tolerar diversos tipos de estrés, entre ellos la radiación ultravioleta gracias a los mecanismos de regulación que posee. La proteína de potenciación del oxígeno (OEE, *Oxygen Evolving Enhancer*) es esencial en el fotosistema I, mientras que la anhidrasa se encarga de transferir carbonos inorgánicos a la membrana plasmática y al citosol hacia el sitio catalítico de la rubisco, la cual cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono a bicarbonato y es esencial en el mecanismo de respiración (Fabre *et al.*, 2007).

La mayoría de estas proteínas aparecen en los cultivos de 7 días, donde las plantas están comenzando a entrar en su fase de crecimiento exponencial y necesitan de un mecanismo energético más activo. Por el contrario, las proteínas que aparecen a 28 días están implicadas en la activación de mecanismos de regulación.

Tabla 14. Proteínas identificadas mediante nanoLC-MALDI-TOF/TOF en el secretoma radicular de *P. patens* implicadas en el metabolismo celular.

PM (kDa)	Nº de acceso	Proteína	Especie	Péptidos 7 días	Péptidos 28 días
52,65	A9SDQ7	Fosfofructoquinasa (PfkB)	<i>P. patens</i>	GMGDLAARVAAVVVGQQGTRLK	
37,44	B9GIA8	Desarrollo relacionado con la dormición	<i>Populus trichocarpa</i>	LSTSFTRSGSILLR	LSTSFTRSGSILLR
43,57	A9TIJ9	Fosfatasa 2C	<i>P. patens</i>		KAAMNNALMGILR
61,75	A9SPI2	Fosfatasa ácida púrpura	<i>P. patens</i>	EAVGDQIYIVR	EAVGDQIYIVR QPDWSAFR SFVAYESR
23,34	D8SI40	Histidin-fosfatasa superfamilia 1	<i>S. moellendorffii</i>	KIAVVSHSFFLSR	
13,65	P84718	Proteína de potenciación del oxígeno (OEE)	<i>Pinus strobus</i>		TNAENEFVTIKK
30,32	A9U5L9	Anhidrasa carbónica clase α	<i>P. patens</i>	QEMELHLVHTSINVTPQR SYTQAIVTAEIFTDGK IQLPFKEIK SPINIVPNNLIPR SYTQAIVTAEIFTDGK	GTGLLQSPINIVPNNLIPR LLQSPINIVPNNLIPR SYTQAIVTAEIFTDGK SQTCTGTLQSPINIVPNNLIPR
84,49	Q6ZDG9	Proteína de transporte	<i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>	IQGIIGPCTSLEKK	

II.VIII.II.V. Regulación

Rensing *et al.* (2008) describen que *P. patens* contiene numerosos mecanismos de regulación del ADN, mecanismos necesarios para mantener el control del genoma en los que intervienen algunas proteínas de unión al ADN y al ATP. También hay proteínas responsables de modificaciones post-transcripcionales como los coactivadores, y proteínas que participan en la ruta del ritmo circadiano de la planta (Snider *et al.*, 2008; Katiyar *et al.*, 2012). Todas estas proteínas se encuentran en los cultivos de *P. patens* de 28 días, los cuales están entrando en su fase senescente, por lo tanto los mecanismos de regulación de la planta son necesarios para intentar mantener su metabolismo activo (Tabla 15).

Tabla 15. Proteínas identificadas mediante nanoLC-MALDI-TOF/TOF en el secretoma radicular de *P. patens* implicadas en la regulación.

PM (kDa)	Nº de acceso	Proteína	Especie	Péptidos 7 días	Péptidos 28 días
95,43	A9S005	Proteína de unión al ADN	<i>P. patens</i>		ERFPMKLNWVR
513,10	A9SH61	Proteína de unión al ADN	<i>P. patens</i>		DSYVELLQELQRLR
210,36	A9SXU5	Proteína de unión al ATP	<i>P. patens</i>		GWMALLVGGPGSGK
12,47	Q5VMV0	Coactivador	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>		TGATAAANRSSSATAER
95,13	C8KHJ1	Proteína asociada al reloj circadiano	<i>P. patens</i>		RFLEALKLYGR

II.VIII.II.VI. Transducción de señal

En el secretoma radicular de *P. patens* se han encontrado numerosas proteínas implicadas en el proceso de replicación del ADN, así como proteínas con repeticiones pentatricopeptídicas (PPR) que participan en los procesos de organización celular en las mitocondrias o plastidios (Small y Petters, 2000) (Tabla 16).

Todas estas proteínas están estrechamente relacionadas con la generación de diversos tipos de estrés y la entrada en la senescencia de las plantas, durante la cual la planta activa rutas de señalización para intentar controlar este proceso. Entre las proteínas que están relacionadas en la señalización se encuentran las quinasas (Thelander *et al.*, 2004) y las proteínas de alta movilidad (HMG, *High Mobility Group*) que son proteínas reguladoras de la expresión génica (Antosch *et al.*, 2012). Mientras que en los cultivos de 7 días aparecen proteínas implicadas en la señalización como las quinasas o las PPR, en los cultivos de 28 días aparecen de forma mayoritaria proteínas relacionadas con la recombinación y la transcripción celular, ligadas al proceso senescente, tal como las proteínas con dominio de repetición de leucinas (LRR, *Leucine Rich Repeat*) o las proteínas de mantenimiento estructural (SMC 2) (*Structural Maintenance of Chromosomes*).

Tabla 16. Proteínas identificadas mediante nanoLC-MALDI-TOF/TOF en el secretoma radicular de *P. patens* implicadas en la transducción de señal.

PM (kDa)	Nº de acceso	Proteína	Especie	Péptidos 7 días	Péptidos 28 días
63,40	B9EXD3	Serin-Treonin quinasas	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	DLKPENLLDLSKGNLK	
70,24	K4BCE1	Protein-quinasa	<i>Solanum lycopersicum</i>		APAVSPNTTLLITDIES
50,81	A9S987	Proteinquinasa	<i>P. patens</i>	DLKPENLLDLSKGNLK	DLKPENLLDLSKGNLK
19,75	D7KWZ0	Proteína de alta movilidad (HMG)	<i>Arabidopsis lyrata</i>	MNLEEKPTMAASR	
92,82	B0LUQ7	Proteína de mantenimiento cromosómico (MCM 4)	<i>Pisum sativum</i>	NIILEKMQIGGRSMR	
64,36	Q10Q32	Proteína con repeticiones pentatricopeptídicas (PPR)	<i>Oryza sativa</i>	HSALLNNHLYNIALMSCER	
165,19	Q01LT5	Integrasa.	<i>Oryza sativa</i>	LALAKFMDVPHYTYMMMMPGPR	
37,36	A9RN95	Proteína con dominio de repetición de leucinas (LRR)	<i>P. patens</i>		LSGNVFTGPIPR IAGMAMAVAR
126,32	B9RSM1	Proteína con dominio de repetición de leucinas (LRR)	<i>Ricinus communis</i>		NLNALEIKNCPNLKR
127,39	A8I8N8	Proteína de mantenimiento estructural (SMC 2)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		LSGEVDANKAEVK

II.VIII.II.VII. Proteínas desconocidas y de función desconocida

Existen varias proteínas que aparecen en cultivos de 7 y 28 días que tienen una función desconocida o son proteínas desconocidas. Estas proteínas requieren un análisis complejo para categorizarlos, ya que no existe información estructural en bases de datos. Además, muchas de éstas se corresponden con proteínas tanto de *P. patens* y otras especies vegetales cuyo genoma está completamente secuenciado (*A. thaliana*, *G. max*, *O. sativa*, *S. lycopersicum*, *Z. mays*), como de otras especies, incluso algunas de ellas alejadas filogenéticamente, lo que puede deberse a una falta de datos de las proteínas con las que éstas tienen semejanza.

II.VIII.III. Proteínas en el desarrollo

El secretoma radicular de las plantas de *P. patens* ha puesto de manifiesto la presencia de proteínas que participan en los procesos como estrés y defensa, la modificación de la pared celular, la senescencia, la obtención de energía, la regulación y la transducción de la señal.

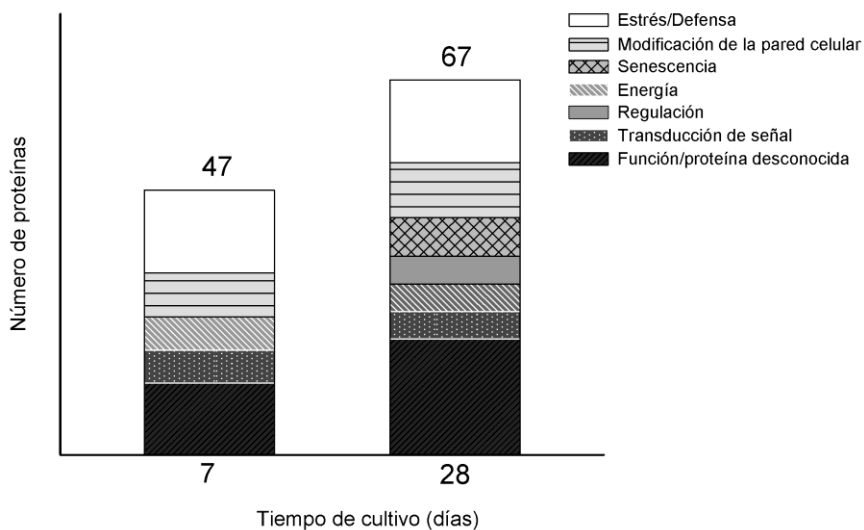


Figura 55. Distribución de las categorías según la función de las proteínas del secretoma radicular de los cultivos de *P. patens* a 7 y 28 días.

En los cultivos de 7 días se identifican menos proteínas que en los cultivos de 28 días (Fig. 55), además dentro de esta identificación podemos comprobar una diferencia entre la etapa de crecimiento (a 7 días) y de senescencia (a 28 días), ya que en esta última etapa aparecen proteínas implicadas en la regulación y la senescencia que no aparecen en las plantas en crecimiento. Esto nos permite comprobar que hay una diferencia en cuanto a la expresión proteica en los diferentes momentos del desarrollo de *P. patens*.

**Estudio de las peroxidasas relacionadas con
la lignificación en pteridófitos**

**III. Estudio de las peroxidasas relacionadas con la
lignificación en *Selaginella martensii***

III.I. Localización histoquímica de peroxidasas y ligninas

Los pteridófitos, ampliamente considerados como las primeras plantas vasculares, poseen ligninas compuestas mayoritariamente por unidades G con una pequeña parte de unidades H, aunque se ha observado que hay pteridófitos que contienen también unidades S (Gómez-Ros *et al.*, 2007b; Espiñeira *et al.*, 2011).

Las ligninas se pueden detectar *in vivo* mediante la tinción del material vegetal. Para establecer la distribución espacial de estas sustancias en las frondes de *S. martensii* se realizaron cortes histológicos y se analizaron con los test de Wiesner (Fig. 56A) y de Mäule (Fig. 56B). Por su parte se localizó la actividad peroxidasa mediante una tinción con TMB (Fig. 56C).

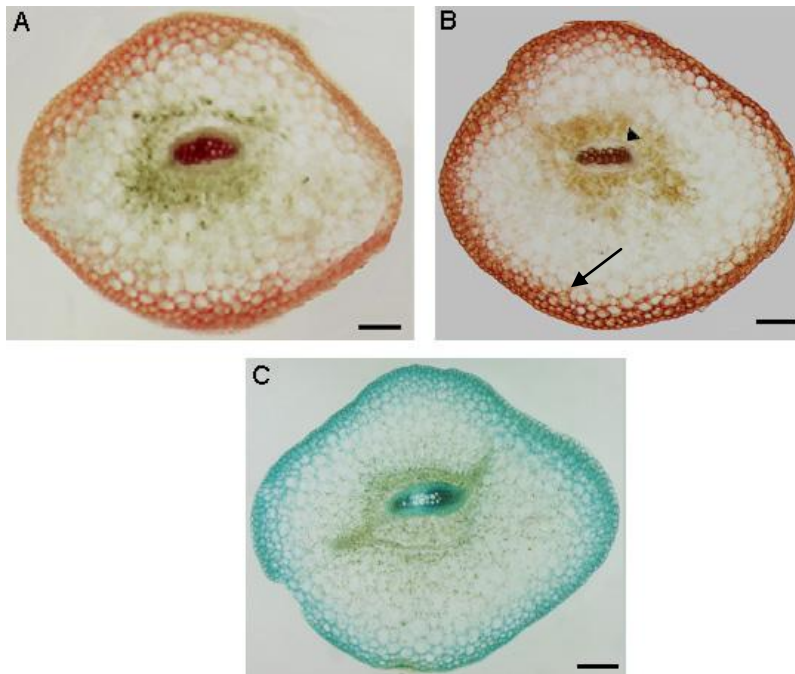


Figura 56. Localización histoquímica de las ligninas en *S. martensii* mediante el test de Wiesner (A) y el test de Mäule (B). Flecha, coloración roja, indicando ligninas de tipo S. Punta de flecha, coloración marrón, indicando ligninas de tipo G. Tinción con TMB para localizar la actividad peroxidasa (verde) (C). Barra 100 μ m.

El test de Wiesner, basado en la reacción del reactivo de floroglucinol con las ligninas en medio ácido, revela la presencia de grupos cinamaldehído (Geiger y Fuggerer, 1979; Pomar *et al.*, 2002) mayoritariamente en el sistema vascular, aunque también se puede comprobar su aparición en la epidermis (Fig. 56A).

La tinción de Mäule permite distinguir entre ligninas de tipo G y S; mientras la coloración roja indica la presencia de ligninas de tipo S en la epidermis y sub-epidermis cortical, el color marrón muestra la localización de ligninas de tipo G en el xilema (Fig. 56B), distribución que se ha observado previamente en *S. moellendorffii* (Weng *et al.*, 2008).

La tinción con TMB reveló la presencia de actividad peroxidasa en la epidermis y en el xilema (Fig. 56C), distribución que coincide con la de las ligninas, a juzgar por los tejidos teñidos con Mäule y Wiesner (Fig. 56 A y B).

Los resultados de las tinciones muestran la colocación de las ligninas y las peroxidasas sugiriendo un papel importante de las isoenzimas de peroxidasa en la formación de lignina (Gómez Ros *et al.*, 2007a; Sato *et al.*, 2009; Espiñeira *et al.*, 2011).

La presencia de ligninas S, consideradas hasta hace poco exclusivas de angiospermas (Boerjan, 2003), se ha detectado mediante tioacidolisis en diversos miembros de los pteridófitos. *Isoetes histrix* contiene en su mayor parte unidades G con una menor cantidad de grupos S, en una proporción G:S de 73:27. *Ceratopteris cornuta* contiene un porcentaje similar de unidades G y S con una proporción de G:S de 52:48. Sin embargo *S. martensii*, contiene una mayor cantidad de unidades S que G, con una proporción H:G:S de 3:27:70 (Gómez-Ros *et al.*, 2007a; Espiñeira *et al.*, 2011).

III.II. Estudio de las peroxidasas de *S. martensii*

Como se ha mencionado previamente, las peroxidasas básicas se han caracterizado en estudios previos como responsables de la oxidación del alcohol sinapílico, especialmente la peroxidasa básica de *Z. elegans* (Gabaldón *et al.*, 2005). De la misma manera que en *M. polymorpha* y en *P.*

patens, se ha estudiado el patrón de isoenzimas de peroxidasas de *S. martensii*, de un extracto de proteína total de sus frondes, por medio de un análisis isoelectroforético (Fig. 57), para comprobar si esta especie contiene peroxidasas homólogas a la de *Z. elegans*.

El patrón electroforético muestra la presencia de peroxidasas ácidas, moderadamente básicas y fuertemente básicas (Fig. 57). Entre estas últimas hay diversas isoenzimas con un pI similar al de la peroxidasa básica de *Z. elegans* (Gabaldón *et al.*, 2005), lo cual parece indicar que estas enzimas podrían estar relacionadas con la lignificación en *S. martensii*. Espiñeira *et al.* (2011) observaron que un extracto de proteína total de las frondes de *S. martensii* contenía peroxidasas capaces de oxidar tanto al alcohol sinapílico como al sinapil aldehído, precursores de las ligninas de tipo S.

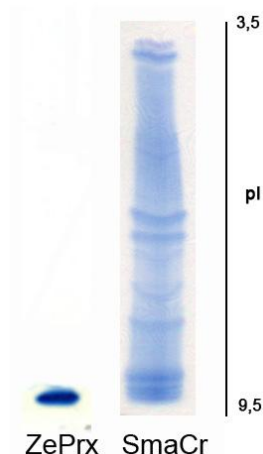


Figura 57. Isoelectroenfoque en condiciones de equilibrio de la peroxidasa de *Z. elegans* (ZePrx) y del extracto crudo de *S. martensii* (SmaCr) después de teñir con 4MN y H₂O₂.

Para confirmar la presencia de peroxidasas capaces de oxidar el alcohol sinapílico se realizaron medidas de la actividad enzimática con dos sustratos artificiales de las peroxidasas, el 4-metoxi- α -naftol y la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), y dos sustratos naturales, los alcoholes coniferílico y sinapílico, precursores de las ligninas de tipo G y S respectivamente (Tabla 17).

Tabla 17. Medida de la actividad peroxidasa del extracto crudo de *S. martensii*. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con la desviación estándar.

	Actividad peroxidasa ($\mu\text{kat ml}^{-1}$)
4-metoxi-α-naftol	11,14 \pm 0,72
3,3',5,5'-tetrametilbencidina	136,63 \pm 1,12
Alcohol coniferílico	59,02 \pm 1,37
Alcohol sinapílico	2,11 \pm 0,18

Las medidas de actividad indican que las peroxidases de *S. martensii* oxidan a todos los sustratos probados, tanto naturales como artificiales. El sustrato más sensible es la TMB, sin embargo hay que destacar también la actividad enzimática que presenta con el alcohol coniferílico (Tabla 17). La importancia de este sustrato es que está implicado en la síntesis de monómeros guayacilo y por lo tanto es uno de los sustratos determinantes a la hora de comprobar si las peroxidases de *S. martensii* participan en la lignificación. Los resultados de la tabla 17 indican que el extracto crudo de *S. martensii* es capaz de oxidar el alcohol sinapílico, lo que indica que *S. martensii* posee peroxidases capaces de sintetizar monómeros siringilo.

El hecho de que *S. martensii* presente la capacidad de oxidar a los sustratos citados y que contenga isoenzimas homólogas a la de *Z. elegans*, lleva a pensar que en esta planta hay peroxidases implicadas en la lignificación. Por lo tanto se planteó purificar aquellas peroxidases que están implicadas en la lignificación de esta especie.

III.III. Purificación de peroxidases

Para la purificación de las peroxidases se realizó un protocolo de tres pasos incluyendo: precipitación con sulfato amónico, cromatografía hidrofóbica en Fenil-Sefarosa y cromatografía catiónica en SP Sefarosa (Fig. 58).

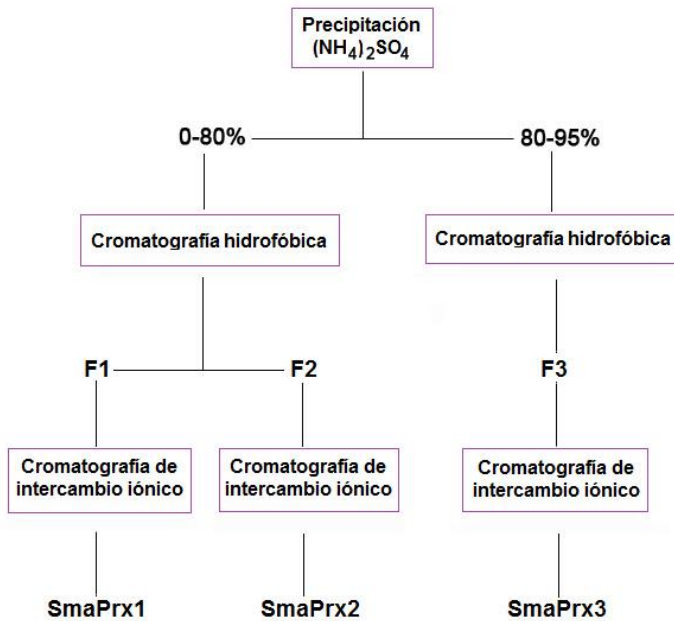


Figura 58. Esquema de la purificación de las peroxidasa de *S. martensii*.

El primer paso fue una precipitación con sulfato amónico para determinar, de acuerdo con los patrones de proteína y peroxidasa, qué fracciones contenían las proteínas de interés. Se realizaron seis fracciones con diferentes concentraciones de sulfato amónico: 0-25, 25-40, 40-50, 50-65, 65-80 y 80-95% (Fig. 59A, B).

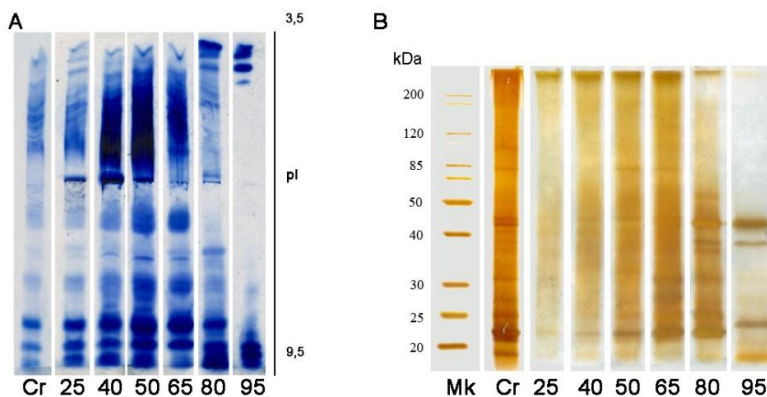


Figura 59. Análisis electroforético de las fracciones obtenidas tras la precipitación fraccionada, con diferentes porcentajes de sulfato amónico, del extracto crudo de *S. martensii*. 0-25, 25-40, 40-50, 50-65, 65-80 y 80-95%. Patrones de isoenzimas de peroxidasa obtenidos por IEF tras teñir con 4MN y H₂O₂ (A) y de proteínas mediante SDS-PAGE (B) después de teñir con nitrato de plata. Cr: Crudo. Mk: Marcador de peso molecular.

A la vista de que los análisis electroforéticos de las fracciones del 0 al 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mostraban patrones similares de peroxidasa (Fig. 59A) y proteínas (Fig. 59B), se resolvió juntarlas como una única fracción. La fracción del 80 al 95% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mostraba como resultado una marcada reducción de la cantidad de proteína, con un patrón mucho más sencillo que la fracción del 0 a 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Por lo tanto, se consideraron dos fracciones diferentes dependiendo del porcentaje de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, una fracción del 0 al 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y otra del 80 al 95% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Después de realizar las precipitaciones del 0-80 y del 80-95%, cada una de estas fracciones se cargó en una columna de Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow.

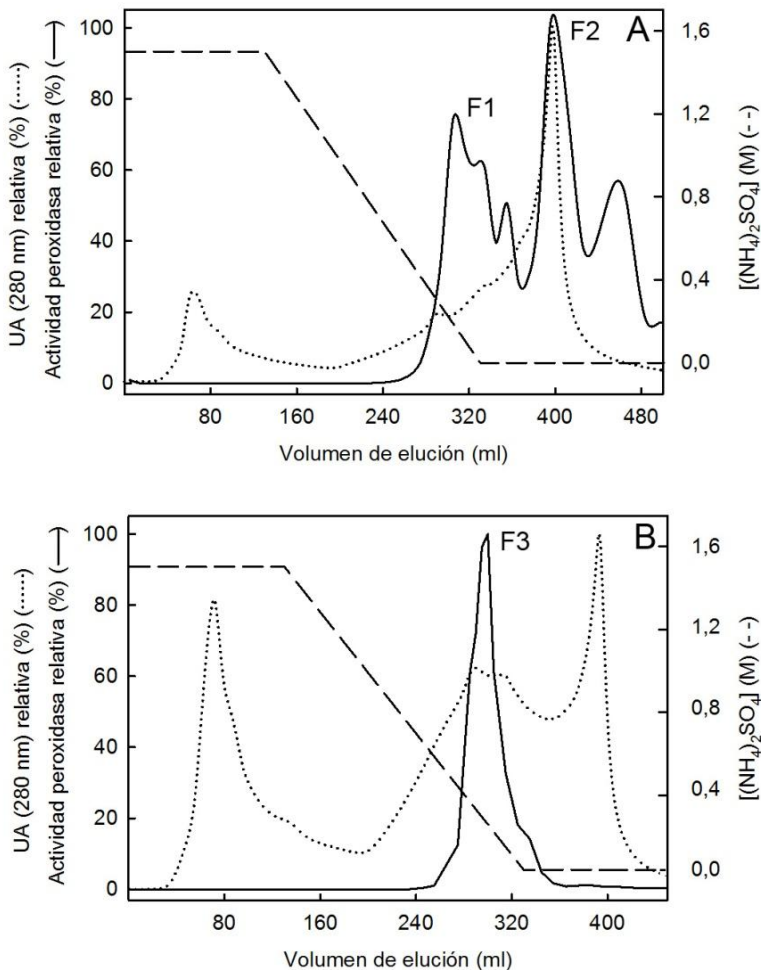


Figura 60. Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-Sefarosa™ 6 Fast Flow del extracto crudo de *S. martensii* procedente de la precipitación con sulfato amónico del 0-80 % (A), y del 80-95% (B). La actividad peroxidasa se corresponde a los valores medidos con TMB.

Tras la realización de esta cromatografía en ambas fracciones precipitadas, los resultados muestran la aparición de tres picos de actividad peroxidasa, dos en la fracción de 0-80% (F1 y F2) y otro en la fracción del 80-95% (F3) (Fig. 60). Los tres picos obtenidos de las cromatografías hidrofóbicas (F1, F2 y F3) se concentraron y dializaron frente a un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

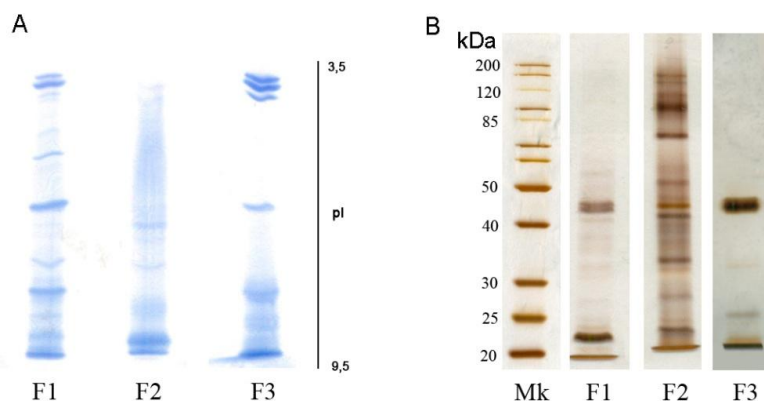


Figura 61. Isoelectroenfoque de las fracciones obtenidas tras la cromatografía hidrofóbica del extracto crudo de *S. martensii* (F1, F2, F3) después de teñir con 4MN y H_2O_2 (A). Análisis mediante SDS-PAGE de las mismas fracciones, después de teñir con nitrato de plata (B). Mk: Marcador de peso molecular.

El análisis mediante IEF (Fig. 61A) reveló la presencia de una gran cantidad de isoenzimas de peroxidasa neutras en la fracción F2, que también presenta el patrón más complejo de proteínas (Fig. 61B). En cuanto a la fracciones correspondientes a la F1 y F3 se observó una gran cantidad de isoenzimas tanto ácidas como básicas (Fig. 61A) presentando a su vez un patrón proteico más sencillo que en el caso de la F2 (Fig. 61B).

III.III.I. Purificación de SmaPrx1

La fracción F1 procedente de la cromatografía hidrofóbica se sometió a una cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sefarosa™ Fast Flow (Fig. 62). Debido a que en esta fracción hay una gran cantidad de isoenzimas fuertemente básicas, se decidió emplear un tampón de pH elevado para realizar la cromatografía catiónica. Este tipo de columna se ha utilizado previamente con éxito en otros trabajos de purificación (Gabaldón *et al.*, 2005; Novo-Uzal *et al.*, 2009a).

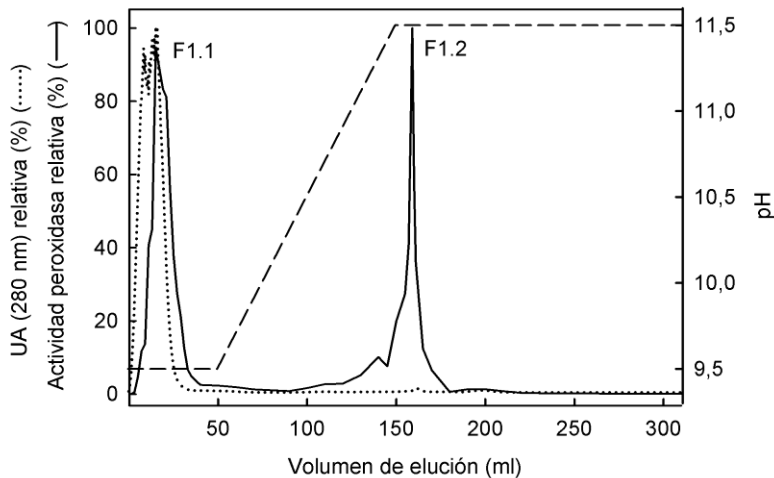


Figura 62. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sefarosa™ Fast Flow de la fracción F1 de *S. martensii*. La actividad peroxidasa se corresponde con los valores medidos con TMB.

En el cromatograma se distingue la presencia de dos picos de actividad peroxidasa, F1.1 y F1.2 (Fig. 62). La matriz retiene las enzimas fuertemente básicas, por lo que el primer pico (F1.1) se corresponde con una fracción compuesta de peroxidases ácidas, neutras y moderadamente básicas, las cuales no son retenidas por la misma, mientras que el pico F1.2 corresponde con una fracción fuertemente básica que eluye a un pH de 11,5 (Fig. 62).

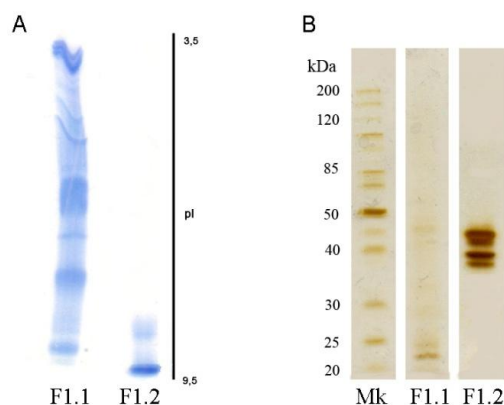


Figura 63. Isoelectroenfoque de las fracciones obtenidas tras la cromatografía catiónica de la fracción F1 procedente de la cromatografía hidrofóbica, después de teñir con 4MN y H₂O₂ (A) y análisis mediante SDS-PAGE de las mismas fracciones, después de teñir con nitrato de plata (B). Mk: Marcador de peso molecular.

Mediante IEF (Fig. 63A) se comprobó que la fracción F1.1 contenía una gran cantidad de isoenzimas tanto ácidas como básicas. Sin embargo, en la fracción F1.2 aparecían varias isoenzimas de carácter básico y una única peroxidasa fuertemente básica. El patrón proteico se determinó mediante SDS-PAGE (Fig. 63B), mostrando una gran cantidad de proteínas en la fracción F1.1 y un total de cuatro proteínas con un peso molecular comprendido entre 35 y 45 kDa en la fracción F1.2, coincidiendo con el peso molecular de las peroxidasas de secreción de clase III (Hiraga *et al.*, 2001).

La tabla de purificación de SmaPrx1 (Tabla 18) indica un aumento notable en la actividad específica de esta fracción a lo largo del proceso de purificación. Con este protocolo se ha conseguido un factor de purificación muy elevado (Tabla 18).

Debido a la baja cantidad de proteínas (40 µg totales) en la muestra final, no fue posible continuar el proceso de purificación por lo que hemos considerado la fracción SmaPrx1 como una fracción de peroxidasas fuertemente básicas semipurificada.

Tabla 18. Purificación de la fracción de peroxidadas básicas SmaPrx1 de *S. martensii*. La actividad peroxidasa ha sido medida con TMB como sustrato. AE: actividad específica.

SmaPrx1	Actividad peroxidasa (nkat)	AE (nkat mg ⁻¹ proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	2041412	385	1	100
Precipitación 0-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	591142	1959	5	29
Cromatografía Fenil-Sefarosa	22860	913	2	1
Cromatografía SP Sefarosa	5004	129881	337	0,02

III.III.II. Purificación de SmaPrx2

Debido a que la fracción F2 procedente de la cromatografía hidrofóbica contenía isoenzimas de carácter moderadamente básico se empleó un tampón con pH 8,2 para la cromatografía de intercambio iónico realizada sobre SP Sefarosa™ Fast Flow y basada en un gradiente salino de KCl 0-1M.

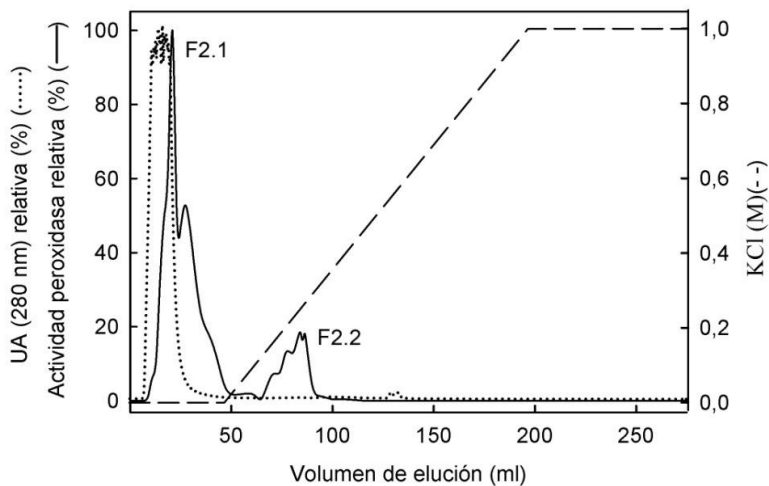


Figura 64. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sefarosa™ Fast Flow de la fracción F2 de *S. martensii*. La actividad peroxidasa se corresponde con los valores medidos con TMB.

En el cromatograma se distingue la presencia de dos picos de actividad peroxidasa, F2.1, que se corresponde con las peroxididasas no retenidas en la columna y F2.2, fracción que eluyó a una concentración 0,15 M de KCl (Fig. 64).

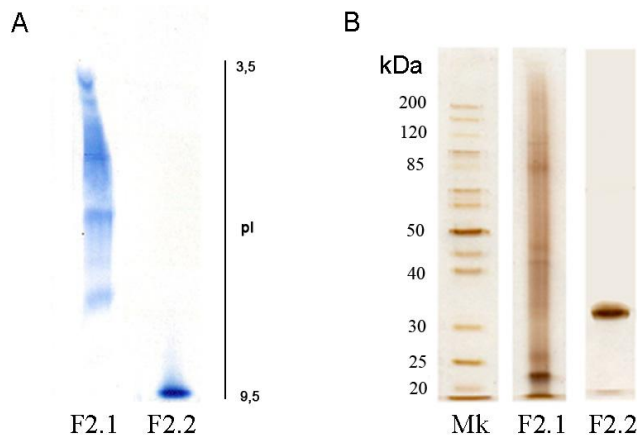


Figura 65. Isoelectroenfoque de las fracciones obtenidas tras la cromatografía catiónica de la F2 procedente de la cromatografía hidrofóbica después de teñir con 4MN y H₂O₂ (A). Análisis mediante SDS-PAGE de las mismas fracciones después de teñir con nitrato de plata (B). Mk: Marcador de peso molecular.

Los resultados del IEF (Fig. 65A) y SDS-PAGE (Fig. 65B) permiten concluir que el primer pico de actividad peroxidasa (F2.1) contiene numerosas enzimas ácidas y neutras, mientras que el segundo pico (F2.2) contiene una única peroxidasa de carácter básico y una única proteína, por lo que se trata de una enzima purificada a homogeneidad, que denominamos SmaPrx2. El isoelectroenfoque reveló que SmaPrx2 (Fig. 65A) es una peroxidasa fuertemente básica con un pI de 9,2.

El proceso de purificación de SmaPrx2 ha dado como resultado un gran aumento de la actividad específica y del factor de purificación con respecto al extracto crudo (Tabla 19).

Tabla 19. Purificación de la peroxidasa básica SmaPrx2 de *S. martensii*. La actividad peroxidasa ha sido medida con TMB como sustrato. AE: actividad específica.

SmaPrx2	Actividad peroxidasa (nkat)	AE (nkat mg ⁻¹ proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	2041412	385	1	100
Precipitación 0-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	591142	1959	5	29
Cromatografía Fenil-Sefarosa	47182	1565	4	2
Cromatografía SP Sefarosa	19616	61300	159	1

III.III.III. Purificación de SmaPrx3

Para la purificación de la fracción F3 proveniente de la cromatografía hidrofóbica se siguió el mismo protocolo que en el caso de la F1, debido a que esta fracción poseía peroxidasa de carácter fuertemente básico.

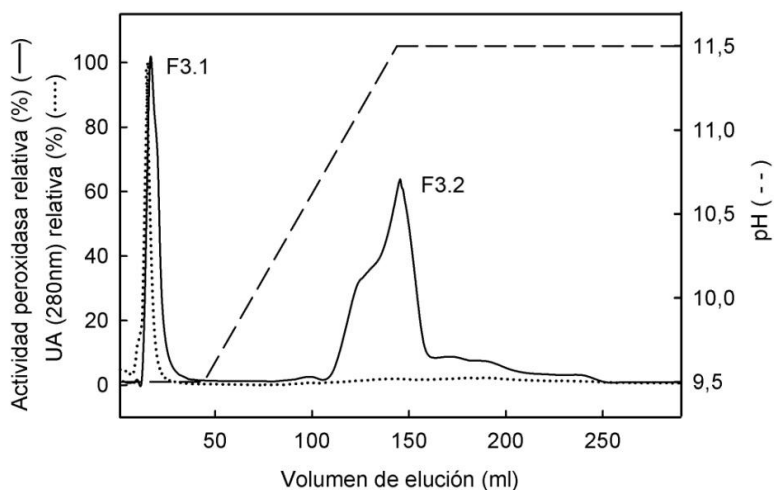


Figura 66. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP SefarosaTM Fast Flow de la fracción F3 procedente de la cromatografía hidrofóbica de *S. martensii*. La actividad peroxidasa se corresponde con los valores medidos con TMB.

El cromatograma obtenido muestra la presencia de dos picos de actividad peroxidasa, F3.1 y F3.2 (Fig. 66). El primer pico (F3.1) se corresponde con una fracción ácida que no queda retenida en la columna, mientras que el pico correspondiente a la fracción de las peroxidasas básicas (F3.2) eluye a un pH de 11,5.

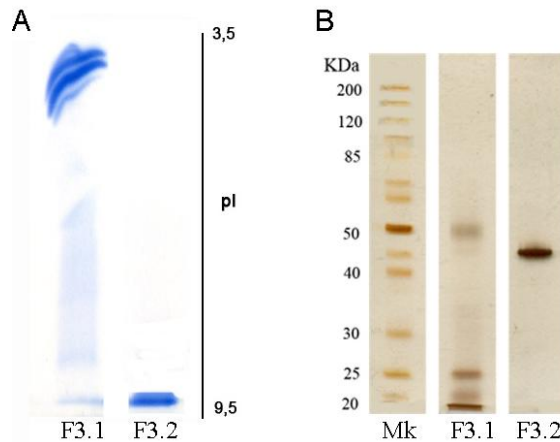


Figura 67. Isoelectroenfoco de las fracciones obtenidas tras la cromatografía catiónica de la F3 procedente de la cromatografía hidrofóbica después de teñir con 4MN y H₂O₂ (A). Análisis mediante SDS-PAGE de las mismas fracciones después de teñir con nitrato de plata (B). Mk: Marcador de peso molecular.

El análisis por isoelectroenfoco con un gradiente de pH de 3-10 (Fig. 67A) reveló que F3.2 es una peroxidasa fuertemente básica con un pI de 9,5 y el SDS-PAGE (Fig. 67B) muestra que el primer pico de actividad peroxidasa (F3.1) contiene numerosas proteínas, mientras que el segundo pico (F3.2) contiene una única proteína. Esta peroxidasa que ha sido purificada a homogeneidad ha sido denominada SmaPrx3.

SmaPrx3 muestra un aumento tanto de la actividad específica de la enzima como del factor de purificación con respecto al crudo (Tabla 20).

Tabla 20. Purificación de la peroxidasa básica SmaPrx3 de *S. martensii*. La actividad peroxidasa ha sido medida con TMB como sustrato. AE: actividad específica.

SmaPrx3	Actividad peroxidasa (nkat)	AE (nkat mg ⁻¹ proteína)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	891487	878	1	100
Precipitación 80-95% (NH ₄) ₂ SO ₄	369003	52063	59	41
Cromatografía Fenil-Sefarosa	48570	31539	36	5
Cromatografía SP Sefarosa	1551	38781	44	0,2

III.IV. Análisis espectral

Las peroxidasas vegetales de secreción de clase III contienen grupos hemo que absorben a una longitud de onda de 403 nm, este pico de absorbancia máximo se conoce como banda de Soret (Kvaratskhelia *et al.*, 1997; López-Molina *et al.*, 2003).

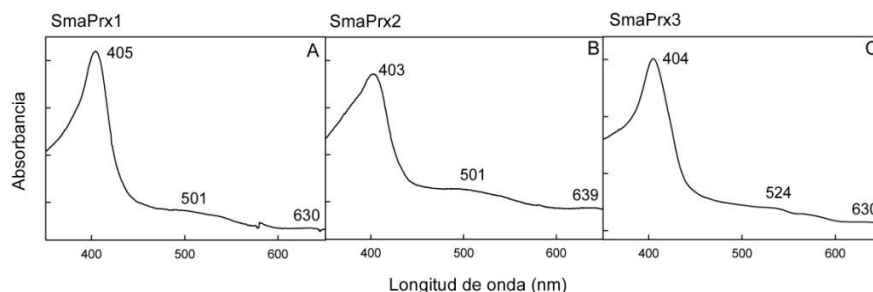


Figura 68. Espectros de absorción de SmaPrx1 (A), SmaPrx2 (B) y SmaPrx3 (C), donde se muestran las bandas de Soret y las bandas α y β .

El espectro de absorción UV-visible de SmaPrx1 detectó un pico a 405 nm y las bandas α y β a 501 y 630 nm, respectivamente (Fig. 68A). En el caso de SmaPrx2 la banda de Soret se detectó a 403 nm, mientras que las bandas α y β se detectaron en 501 y 639 nm, respectivamente (Fig. 68B). Finalmente

la banda de Soret de SmaPrx3 se observó a 404 nm y las bandas α y β aparecieron a 524 y a 630 nm (Fig. 68C).

Estos resultados indican que estas peroxidases son de alto espín y pertenecen al grupo de peroxidases vegetales de secreción de clase III.

III.V. Determinación del peso molecular

El peso molecular de las peroxidases purificadas a homogeneidad de *S. martensii*, SmaPrx2 y SmaPrx3 se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS.

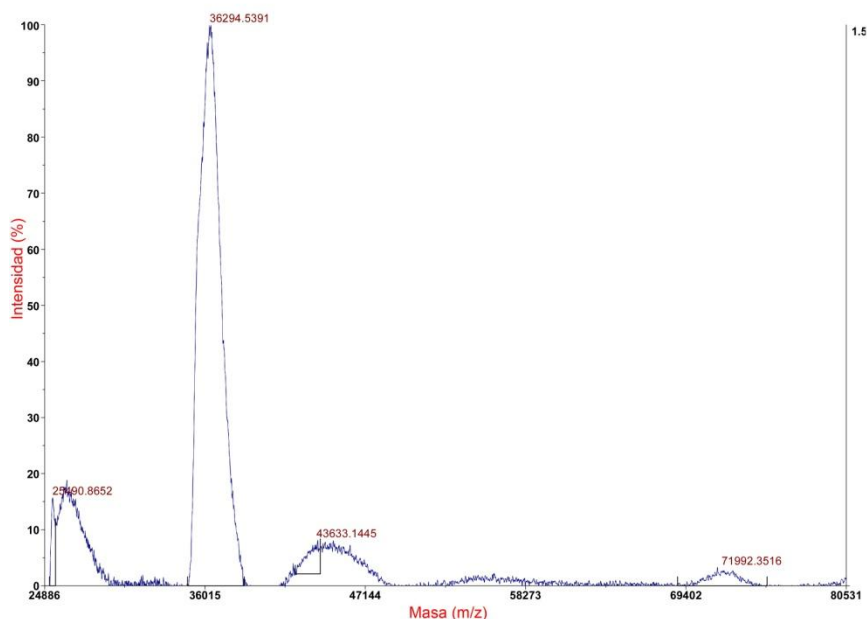


Figura 69. MALDI-TOF MS de peso molecular de la peroxidasa SmaPrx2 de *S. martensii*.

Los datos obtenidos del análisis MALDI-TOF para la SmaPrx2 (Fig. 69) muestran un pico con m/z de 36294,54 y tres picos más con m/z de 25490,89, 43633,14 y 71992,35 respectivamente. De este análisis se deduce que el peso molecular de la peroxidasa SmaPrx2 es de 36295 Da, el cual se encuentra dentro del rango de la masa molecular típica de las peroxidases (Gabaldón *et*

al., 2005). Las otras señales detectadas parecen ser artefactos debidos a la manipulación de la muestra.

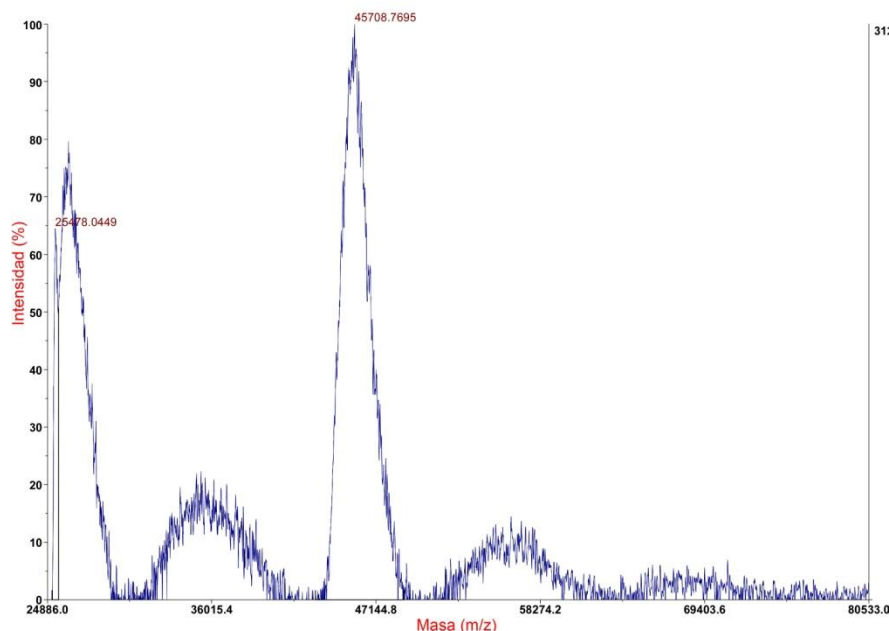


Figura 70. MALDI-TOF MS de peso molecular de la peroxidasa SmaPrx3 de *S. martensii*.

En el análisis de la peroxidasa SmaPrx3 se obtuvieron dos picos con m/z de 25478,04 y 45708,77 (Fig. 70). Así, se puede concluir que esta peroxidasa presenta un peso molecular de 45709 Da, mientras que el otro pico se corresponde con un artefacto debido a la manipulación de la muestra.

III.VI. Dependencia del pH

El pH es crítico para la estabilidad del grupo hemo: con valores de pH demasiado bajos o demasiado altos se puede ver alterado el sitio activo de la enzima e impedir la unión del grupo hemo (Adams, 1997). Para comprobar la dependencia de pH de SmaPrx2 y SmaPrx3 se realizaron medidas de actividad peroxidasa variando de 4,0 a 9,0 el pH del tampón en la mezcla de reacción (Fig. 71).

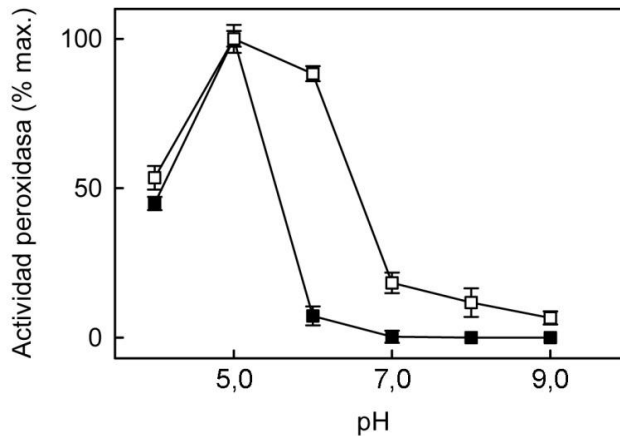


Figura 71. Medida de actividad peroxidasa de SmaPrx2 (■) y SmaPrx3 (□) frente a diversos valores de pH del tampón. Los resultados son la media de tres experimentos independientes, las barras de error representan la desviación estándar.

Mientras que SmaPrx2 muestra un máximo de actividad a pH 5,0 para luego disminuir rápidamente sin mostrar actividad a valores de pH por encima de 6,0, SmaPrx3 muestra un rango más amplio de pH donde permanece activa, también con un máximo de actividad a pH 5,0. Estos resultados coinciden, al igual que con PpPrx, con otras peroxidosas purificadas, en las que se determinó que el pH óptimo (Mika y Lühje, 2003; Cardinali *et al.*, 2011).

III.VII. Especificidad de sustrato

Las peroxidosas purificadas se midieron usando como sustratos ácido ascórbico, NADH, ácido indolacético (AIA), ácido ferúlico y los alcoholes coniferílico y sinapílico. Estos compuestos permiten valorar las posibles funciones de cada isoenzima de peroxidasa dependiendo de la actividad.

Tabla 21. Actividades específicas (nkat μg^{-1} proteína) de las peroxididasas purificadas de *S. martensii* en presencia de diferentes sustratos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes con la desviación estándar. N.d: no detectado.

Sustrato	SmaPrx1	SmaPrx2	SmaPrx3
Ácido ascórbico	n.d.	n.d.	n.d.
NADH	0,02 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00
AIA	0,02 \pm 0,00	0,49 \pm 0,01	0,07 \pm 0,00
Ácido ferúlico	28,02 \pm 1,14	2,56 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00
Alcohol coniferílico	44,09 \pm 0,65	3,60 \pm 0,10	19,00 \pm 0,10
Alcohol sinapílico	62,09 \pm 3,40	0,78 \pm 0,03	1,94 \pm 0,02

Los resultados de la tabla 21 muestran que las tres peroxididasas son capaces de oxidar todos los sustratos a excepción del ácido ascórbico, lo que parece indicar que éstas pertenecen a las peroxididasas vegetales de secreción de clase III, y, aunque todas son capaces de oxidar el NADH, éste no es un buen sustrato para ninguna de ellas. Además, SmaPrx2 presenta una actividad moderada frente al ácido indolacético (0,49 \pm 0,01 nkat μg^{-1} proteína), hecho ya descrito en trabajos anteriores que indican que las peroxididasas son capaces de oxidar tanto NADH como AIA, mostrando una actividad enzimática generalmente baja (Brownleader *et al.*, 1995; Vitali *et al.*, 1998; Jouili *et al.*, 2008).

A pesar de que el NADH es un sustrato pobre para las tres peroxididasas, podría tener un papel importante en el desarrollo de la planta. El peróxido de hidrógeno es necesario para el ciclo de peroxidativo de las peroxididasas, pudiendo ser generado por diferentes enzimas como las NADPH oxididasas de membrana (Ros Barceló *et al.*, 2002) y las oxalato oxididasas (Møller y McPherson, 1998), pero las propias peroxididasas son capaces de usar NADH para producir H_2O_2 (Liszkay *et al.*, 2003). El peróxido de hidrógeno es generalmente el cosustrato limitante y actúa como un factor de control en la lignificación. Una disminución en la disponibilidad de H_2O_2 provoca una drástica reducción en la biosíntesis de lignina y el aumento de H_2O_2 provoca un incremento en el contenido de lignina (Gabaldón *et al.*, 2005; Kärkönen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008). Por lo tanto, una catálisis eficiente del H_2O_2 puede

ser crítica para mantener la biosíntesis de lignina y la integridad de la pared celular. Por otra parte, las peroxidases catiónicas parecen ser más eficientes en la oxidación de NADH que sus homólogas aniónicas (Sergio *et al.*, 2009; de Marco *et al.*, 1999).

El ácido ferúlico es un sustrato relacionado con la pared celular que puede estar unido por enlaces éter a los componentes hemicelulósicos y proveer de puntos de crecimiento al polímero de lignina (Jacquet *et al.* 1995), además también puede ser incorporado en la suberina de la pared celular (Hiraga *et al.* 2001). De este modo, los datos de actividad enzimática de SmaPrx1 y SmaPrx2 frente al ácido ferúlico ($28,02 \pm 1,14$ y $2,56 \pm 0,01$ nkat μg^{-1} proteína) parecen indicar que estas peroxidases están relacionadas con el desarrollo de la pared celular. Además, los datos frente a los alcoholes coniferílico y sinapílico (Tabla 21) obtenidos de SmaPrx1, SmaPrx2 y SmaPrx3 respectivamente, indican que todas estas peroxidases podrían participar en la biosíntesis de monómeros guayacilo y siringilo. Así, todas las peroxidases purificadas son peroxidases de secreción de clase III implicadas en la lignificación de *S. martensii*.

III.VIII. Caracterización cinética

Con las peroxidases purificadas a homogeneidad (SmaPrx2 y SmaPrx3), se hicieron medidas con diversos sustratos para obtener sus constantes cinéticas. Los sustratos empleados fueron los alcoholes coniferílico y sinapílico, el ácido ferúlico (sólo en el caso de la SmaPrx2) y el H_2O_2 . El H_2O_2 se usó en condiciones saturantes (0,5 mM) en las medidas con los alcoholes cinamílicos y el ácido ferúlico, mientras que para hacer la caracterización cinética con el H_2O_2 fue el alcohol coniferílico el que se usó en condiciones saturantes (0,1 mM). Los valores de K_M y V_{\max} fueron calculados de acuerdo a las ecuaciones de Lineweaver-Burk (Tabla 22).

Tabla 22. Valores de K_M , K_{cat} y K_{cat}/K_M de las peroxididasas purificadas de *S. martensii* para los alcoholes coniferílico y sinapílico, ácido ferúlico y H_2O_2 .

Enzima	Sustrato	K_M (μM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} s^{-1}$)
SmaPrx2	Alcohol coniferílico	79,0	280,3	3,55
	Alcohol sinapílico	69,5	80,8	1,16
	Ácido ferúlico	34,7	186,3	5,37
	H_2O_2	686,5	289,8	0,42
SmaPrx3	Alcohol coniferílico	73,9	2114,0	28,63
	Alcohol sinapílico	48,4	264,3	5,46
	H_2O_2	312,7	1345,0	4,30

A partir de las determinaciones de velocidad inicial (V_0) llevadas a cabo utilizando cinco concentraciones de cada sustrato se estimaron la K_M y la V_{max} , valores que nos permitieron evaluar la eficiencia cinética de las enzimas purificadas (Tabla 22).

Para la SmaPrx2 los valores de la K_M aparente fueron similares en ambos alcoholes (79,0 μM para el coniferílico y el 69,5 μM para el sinapílico), mientras que el valor más bajo correspondió al ácido ferúlico (34,7 μM), lo que nos indica que esta enzima tiene una mayor afinidad por este sustrato. La K_M aparente para el ácido ferúlico no se calculó en el caso de SmaPrx3 debido a que era un pobre sustrato de esta enzima. Para esta peroxidasa, la K_M aparente del alcohol sinapílico fue inferior a la de alcohol coniferílico (48,4 μM y 73,9 μM , respectivamente), lo que indica una mayor afinidad de esta enzima por el alcohol sinapílico (Tabla 22). Estos resultados concuerdan con las actividades específicas calculadas previamente (Tabla 21).

Basándonos en la eficacia catalítica (K_{cat}/K_M), el mejor sustrato para la SmaPrx2 es el ácido ferúlico, mientras que para la SmaPrx3 es el alcohol coniferílico. Por otra parte, SmaPrx3 muestra una alta eficiencia en la oxidación de los dos alcoholes relacionados con la lignificación, lo que sugiere una mayor participación de SmaPrx3 en la formación de lignina que SmaPrx2. En cuanto al peróxido de hidrógeno se observaron importantes diferencias entre las dos peroxididasas purificadas, puesto que el valor K_M aparente para la SmaPrx2 fue dos veces mayor que para la SmaPrx3 (686,5 μM y 312,7 μM). El

valor de la eficiencia catalítica de SmaPrx3 es 10 veces mayor que el de SmaPrx2, lo que indica que SmaPrx3 es mucho más eficiente oxidando peróxido de hidrógeno, lo cual podría ser importante cuando la disponibilidad de peróxido de hidrógeno es limitante.

Al comparar los valores de K_M de ambas peroxidases purificadas con otras implicadas en la lignificación, podemos comprobar que tanto SmaPrx2 como SmaPrx3 poseen valores muy similares a las de esas otras peroxidases. Por ejemplo, Koutaniemi *et al.* (2005) purificaron dos peroxidases básicas responsables de la lignificación de *Picea abies*, cuyas K_M para el alcohol coniferílico fueron de 16,7 y 23,2 μM . La peroxidasa básica de *Z. elegans* (ZePrx) muestra una K_M para los alcoholes coniferílico y sinapílico de 83 y 15 μM , respectivamente (Gabaldón *et al.*, 2005). La TPX1 es una peroxidasa relacionada con la síntesis de lignina y suberina en tomate, y muestra una alta afinidad por la siringaldazina, un análogo de los grupos siringilo de las ligninas con una K_M de 11,4 μM (Quiroga *et al.*, 2000). La eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M) en ZePrx muestra una mayor afinidad por el alcohol sinapílico que por los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, con una K_{cat}/K_M de 25,46 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ para el alcohol sinapílico y 1,20 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ para el alcohol coniferílico. En tomate, la TPX1 muestra una K_{cat}/K_M de 1,50 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ para la siringaldazina (Quiroga *et al.*, 2000). Los resultados de la SmaPrx2 y SmaPrx3 son similares para ambos alcoholes. SmaPrx2 tiene una K_{cat}/K_M para el alcohol sinapílico de 1,16 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, valor muy similar al de TPX1. Sin embargo, SmaPrx3 muestra una K_{cat}/K_M de 5,46 $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ para el alcohol sinapílico, cinco veces superior que el valor de TPX1, pero menor que el mostrado por ZePrx. Estos datos apoyan los resultados de que ambas peroxidases podrían estar implicadas en la lignificación, siendo más destacable el papel de SmaPrx3 en la formación de lignina.

III.IX. Identificación de SmaPrx2 y SmaPrx3 por MALDI-TOF MS/MS

Las peroxidetasas purificadas a homogeneidad SmaPrx2 y SmaPrx3 se digirieron con tripsina y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, obteniéndose su huella peptídica (Fig. 72 y 73).

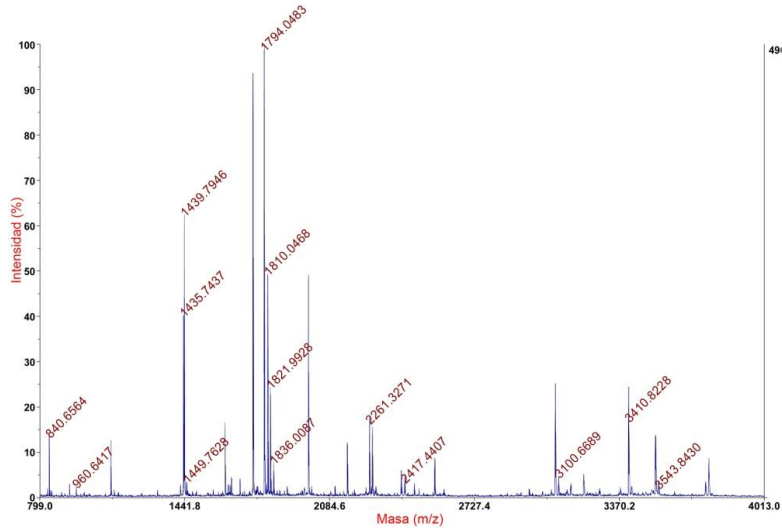


Figura 72. Huella peptídica obtenida de los fragmentos trípticos de SmaPrx2.

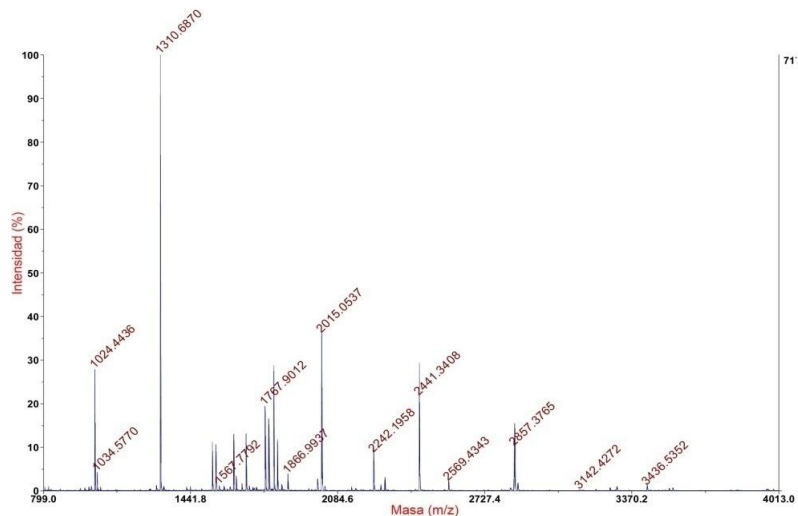


Figura 73. Huella peptídica obtenida de los fragmentos trípticos de SmaPrx3.

Las masas obtenidas en la huella peptídica se compararon con la base de datos Mascot sin obtenerse ninguna coincidencia, lo cual indica que estas proteínas purificadas no han sido previamente secuenciadas.

Los fragmentos trípticos obtenidos mediante la huella peptídica se analizaron con MALDI-TOF/TOF MS/MS, y se buscaron coincidencias en Mascot, logrando las identificaciones indicadas en la tabla 23.

Tabla 23. Péptidos obtenidos de la digestión tríptica y análisis con MALDI-TOF/TOF MS/MS de SmaPrx2 y SmaPrx3. Identificación mediante la base de datos Mascot. El peso molecular de la proteína se ha determinado mediante MALDI-TOF/TOF.

Enzima	Masa (Da)	Secuencia de péptidos	Organismo (Nº de acceso)
SmaPrx2	1804,93	DATYFGGMFYTVPTGR	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002990689)
	1536,78	DVEMFALGNNNSAR	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002990689)
	1821,13	GLSVHDLVLLSGGHTIGR	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002990689)
	2856,40	LFFHDCFVQCGDGSILLESTPTAGR	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002990689)
	2241,22	ANVEAVCPGVVSCADIVALAAR	<i>Sorghum bicolor</i> (XP_002453592)
SmaPrx3	2260,32	GLLRSDQELTLDSETESIVR	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002991683)
	3085,66	LFFHDCFVEGCDGSLLDASADGAVIEK	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002991683)
	1810,05	DSVVLTGAPFFVMPTGR	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002991683)
	1990,11	VALDRGSEFVVDNSYYR	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002991683)
	1439,79	SFAGDENRFQLR	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002991683)
	1114,74	AELQQACPR	<i>S. moellendorffii</i> (XP_002991683)
	1744,01	ACPGVVSCADILAIAR	<i>Brassica campestris</i> (ACT35473)

En SmaPrx2, cuando se procedió a la búsqueda de los fragmentos individuales mediante Mascot, se identificaron cinco fragmentos trípticos (Tabla 23). Uno de ellos correspondía a la secuencia ANVEAVCPGVVSCADIVALAAR de $m/z=2241,22$ presente en una proteína de *Sorghum bicolor* (número de acceso XP_002453592) (Paterson *et al.*, 2009), que está clasificada como una proteína hipotética y mediante blast se observó que se correspondía con una peroxidasa. El péptido identificado está conservado entre las peroxidasas de secreción, ya que contiene dos cisteínas entre las que se establecen los puentes disulfuro. Los otros cuatro péptidos han sido encontrados en la base de datos de *S. moellendorffii*, identificándose como una proteína hipotética de esta especie (número de acceso XP_002990689, denominada SmPrx05a de acuerdo con la PeroxiBase). Esta proteína contiene regiones conservadas de las peroxidasas, por lo que se ha clasificado como tal. Los péptidos

identificados fueron DATTYFGGMFYTVPTGR con $m/z=1804,93$, el cual contiene una lisina conservada que se ha identificado como un determinante estructural de las peroxidases de tipo siringilo (Ros Barceló *et al.*, 2007), DVEMFALGNNSAR con $m/z=1536,78$ y GLSVHDLVLLSGGHTIGR con $m/z=1821,13$. Este último péptido contiene un lugar de unión al calcio y la histidina proximal de unión al grupo hemo, característica típica de las peroxidases vegetales de clase III. Finalmente se identificó el péptido LFFHDCFVQGCDGSILLESTPTAGR con $m/z=2856,40$, el cual contiene un sitio activo formado por una fenilalanina y una histidina importantes en el proceso catalítico y una lisina implicada en el proceso de unión al calcio.

Los péptidos identificados de la SmaPrx2 forman un total del 29% de la proteína secuenciada. En la figura 74 se han alineado estos péptidos frente a la proteína SmPrx05a de *S. moellendorffii*.

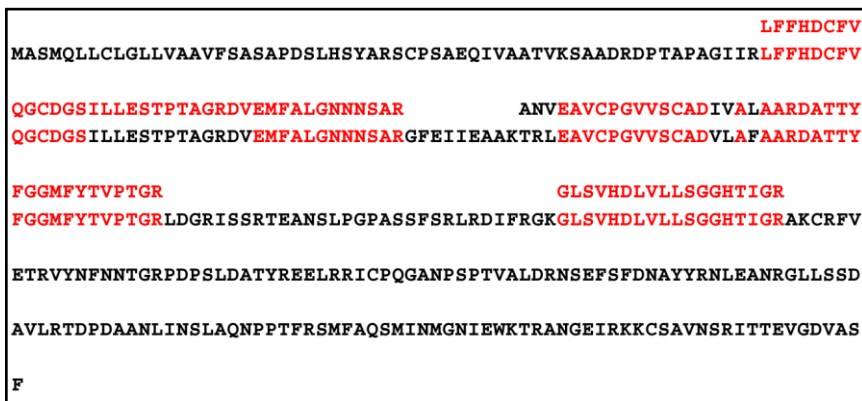


Figura 74. Alineamiento de los cinco péptidos trípticos internos obtenidos de SmaPrx2 con SmPrx05a de *S. moellendorffii* (número acceso XP_002990689), mostrando en color rojo aquellos aminoácidos coincidentes entre las dos proteínas.

Tras la digestión tríptica de SmaPrx3 se identificaron un total de siete péptidos (Tabla 23), entre los cuales se halla el péptido ACPGVVSCADILAI AAR con $m/z=1744,01$, correspondiente con la peroxidasa 52 de *Brassica campestris* (número de acceso ACT35473), el cual es un péptido conservado entre las peroxidases de secreción, con dos cisteínas entre las que se establecen los puentes disulfuro. Los otros seis péptidos identificados mostraron coincidencia con una proteína de *S. moellendorffii*

(número de acceso XP_002991683, denominada como SmPrx01b de acuerdo a la PeroxiBase), la cual se ha identificado como una peroxidasa mediante Blast debido a los dominios conservados que contiene, típicos de esta clase de enzimas. Entre los péptidos identificados están VALDRGSEFVVDNSYYR con $m/z=1990,11$ y LFFHDCFVEGCDGSLLLDASADGAVIEK con $m/z=3085,66$, los cuales presentan una fenilalanina y una histidina conservadas del sitio activo y una lisina esencial para el proceso de unión al calcio. Otro de los péptidos identificados fue DSVVLTGAPFFVMPTGR con $m/z=1810,05$ y que contiene una lisina que se ha descrito como un determinante estructural de las peroxidosas siringilo (Ros Barceló *et al.*, 2007). Los otros tres péptidos identificados fueron GLLRSDQELTLDSETESIVR con $m/z=2260,32$, SFAGDENRFQLR con $m/z=1439,79$ y AELQQACPR con $m/z=1114,74$.

Los péptidos identificados de la SmaPrx3 forman un total del 35% de la proteína secuenciada. En la figura 75 se han alineado estos péptidos frente a la proteína SmPrx01b de *S. moellendorffii*.

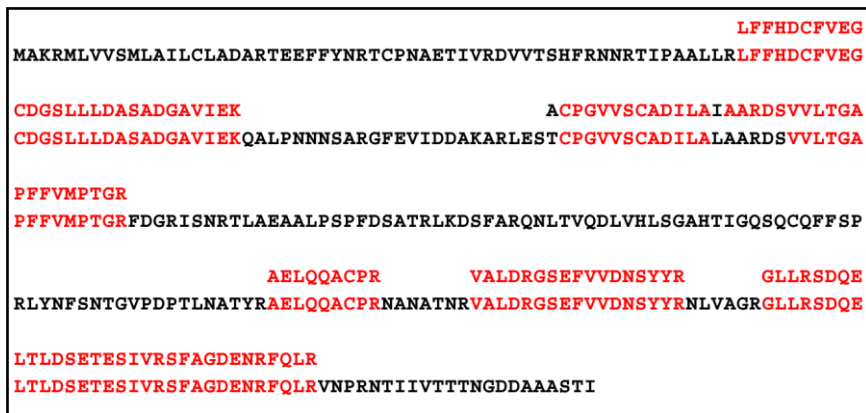


Figura 75. Alineamiento de los siete péptidos tripticos internos obtenidos de SmaPrx3, con SmPrx01b de *S. moellendorffii* (número acceso XP_002991683), mostrando en color rojo aquellos aminoácidos coincidentes entre las dos proteínas.

Todos los péptidos identificados de las peroxidosas *S. martensii* son nuevos en las bases de datos, ya que no hay peroxidosas secuenciadas de esta especie. Sin embargo, otra especie del género *Selaginella*, *S. moellendorffii*, ha sido secuenciada en su totalidad (Banks *et al.*, 2011), habiéndose encontrado en su genoma 179 peroxidosas de acuerdo con la

PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>). Esta información ha sido determinante para identificar los péptidos obtenidos mediante la digestión trípica de ambas peroxidases.

Teniendo en cuenta la gran similitud entre los péptidos de las proteínas purificadas de *S. martensii* y las proteínas de *S. moellendorffii*, y la cercanía evolutiva de ambas especies, se puede plantear la hipótesis de que las proteínas enteras de *S. martensii* sean muy similares a las de *S. moellendorffii*. Debido a esta similitud, se realizó un análisis teórico utilizando las peroxidases SmPrx05a y SmPrx01b de *S. moellendorffii* (Fig.74 y 75).

Mediante el programa TargetP se puede prever que ambas proteínas siguen la vía secretora, ya que muestran la presencia de un péptido señal, lo que encaja bien con el hecho de ser peroxidases de clase III. De acuerdo a su pl teórico, estas proteínas son peroxidases catiónicas, con un pl de 7,74 para SmPrx05a y de 7,12 para SmPrx01b. Debido a que este cálculo no contempla ni los dos iones calcio ni el grupo hemo hay que sumarle dos unidades a cada una (Welinder *et al.*, 2002). Después de esta corrección, los pl de ambas proteínas de *S. moellendorffii* coinciden con el pl experimental de las dos peroxidases purificadas (SmaPrx2 y SmaPrx3) de *S. martensii*.

Para confirmar la naturaleza siringilo de estas peroxidases en base a su secuencia primaria, se procedió a hacer un alineamiento entre los fragmentos trípticos obtenidos de cada una de las peroxidases frente a otras peroxidases descritas en la bibliografía como peroxidases de tipo siringilo, por su capacidad experimental de oxidar el alcohol sinapílico, de modo que se pudo establecer la presencia de los determinantes estructurales de tipo siringilo (Fig.76). Estos determinantes han sido identificados por Ros Barceló *et al.* (2007) en otras especies, comprobándose que están altamente conservados.

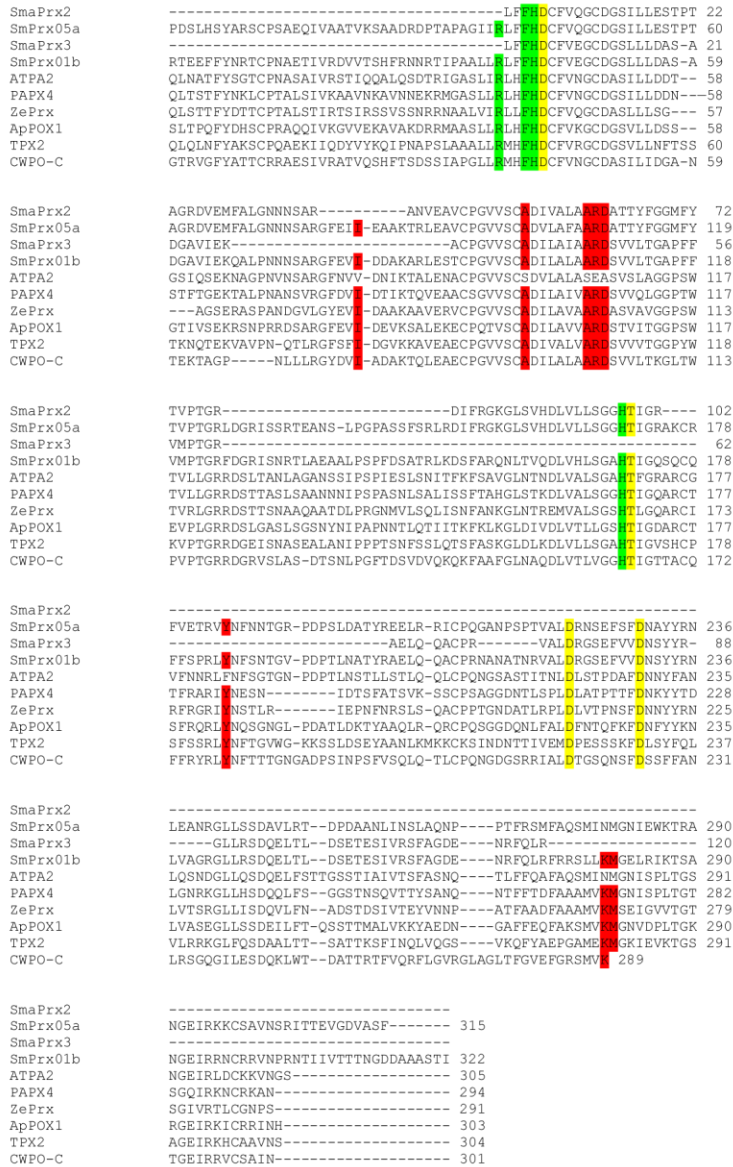


Figura 76. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *S. martensii* SmaPrx2 y SmaPrx3, *S. moellendorffii* SmPrx05a y SmPrx01b, *A. thaliana* ATPA2 (CAA68212), *P. abies* PAX4 (CAH10839), *Z. elegans* ZePrx (CAI54302), *Asparagus officinalis* AoPOX1 (BAA94962), *Solanum lycopersicum* TPX2 (AAA65636) y *Populus alba* CWPO-C (BAE16616). Los residuos conservados importantes para el mecanismo catalítico se han resaltado en verde; los residuos de unión al Ca²⁺ están sombreados en amarillo y los determinantes estructurales de las peroxidasa de tipo siringilo se han coloreado en rojo.

De este modo, estos motivos estructurales son considerados como necesarios y suficientes para determinar la actividad siringil oxidasa de las peroxidasa, actividad que está ausente en ATP A2 y HRP2 A2, dos

peroxidasas tipo guayacilo. El alineamiento se realizó entre SmaPrx2 y SmaPrx3 de *S. martensii* y SmPrx05a y SmPrx01b de *S. moellendorffii*, ATPA2 (CAA68212) de *Arabidopsis thaliana*, PAPX4 (CAH10839) de *Picea abies*, ZePrx (CAI54302) de *Zinnia elegans*, AoPOX1 (BAA94962) de *Asparagus officinalis*, TPX2 (AAA65636) de *Solanum lycopersicum* y CWPO-C (BAE16616) de *Populus alba*, dando como resultado, tanto en SmaPrx2 como en SmaPrx3 la presencia de determinantes siringilo (Fig.76, sombreado rojo).

La evidencia de que estas peroxidasas contienen estos motivos estructurales está de acuerdo con la capacidad experimental de SmaPrx2 y SmaPrx3 de oxidar el alcohol sinapílico *in vitro* y obtener una K_M baja para este sustrato. Por lo tanto, estos resultados apoyan a todos los datos previamente expuestos, que ambas peroxidasas participan en la lignificación de *S. martensii*.

CONCLUSIONES

- i. *M. polymorpha*, *P. patens* and *S. martensii* contain basic peroxidases homologous to the basic peroxidase from *Zinnia elegans* involved in lignification.
- ii. A colocalization between peroxidase activity and lignin distribution was observed in *M. polymorpha* rhizoids.
- iii. MpPrx, a semi-purified fraction of basic peroxidases from *M. polymorpha*, shows high capacity to oxidize the *p*-hydroxycinnamyl alcohols precursors of guaiacyl and syringyl moieties, providing evidence of the involvement of these peroxidases in lignification.
- iv. A strongly basic peroxidase, PpPrx, was purified to homogeneity from *P. patens* plants. It shows kinetic properties similar to peroxidases involved in cell wall development and maturation. PpPrx happened to be a class III peroxidase with high sequence homology to peroxidases involved in lignification in other vascular plant species.
- v. The purified peroxidase PpPrx was enhanced under saline and oxidative stress.
- vi. The proteome of *P. patens* rhizoid exudates was evaluated in two stages of development of the plants. 93 proteins were identified at 7 and 28 days of development in liquid medium. These proteins were mainly related to stress, defense, cell wall modification and senescence, but other proteins related to energy production, regulation and signal transduction were also identified.
- vii. A colocalization between peroxidase activity and lignin distribution was observed in *S. martensii* fronds.
- viii. Three basic peroxidases, SmaPrx1, SmaPrx2 and SmaPrx3, were purified from *S. martensii* fronds. Their enzymatic and kinetic properties suggest their involvement in cell wall maturation and specially lignification. The ability of SmaPrx2 and SmPrx3 in

oxidizing sinapyl alcohol, along with the presence of structural determinants of syringyl peroxidases suggests these two purified enzymes are responsible for the synthesis of syringyl moieties in *S. martensii* lignins.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K.** 1997. Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.
- Abeles FB, Biles CL.** 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol* 95: 269-273.
- Adams JB.** 1997. Regeneration and the kinetics of peroxidase inactivation. *Food Chem* 60: 201-206.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchí-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA.** 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* 60: 377-390.
- Aloni R, Feigenbaum P, Kalev N, Rozovsky S.** 2000. Hormonal control of vascular differentiation in plants: the physiological basis of cambium ontogeny and xylem evolution. In *Cell and molecular biology of wood formation* R. Savidge, J. Barnett and R. Napier, eds., BIOS Scientific. Oxford, UK 223-236.
- Antosch M, Mortensen SA, Grasser KD.** 2012. Plant proteins containing high mobility group Box DNA-Binding domains modulate different nuclear processes. *Plant Physiol* 159: 875-883.
- Aoyama W, Sasaki S, Matsumura S, Mitsunaga T, Hirai H, Tsutsumi Y, Nishida T.** 2002. Sinapyl alcohol-specific peroxidase isoenzyme catalyses the formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol. *J Wood Sci*: 497-504.
- Apel K, Hirt H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Arencibia AD, Bernala A, Zayasa C, Carmonaa E, Corderob C, González G, García R, Santanaa I.** 2012. Hydrogen peroxide induced phenylpropanoids pathway eliciting a defensive response in plants micropropagated in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Sci* 195: 71-79.
- Arrieta-Baez D, Stark RE.** 2006. Modelling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: cross-coupling and dimerization reactions. *Phytochemistry* 67: 743-753.
- Audenaert K, Pattery T, Cornelis P, Höfte M.** 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin. *Mol Plant Microbe In* 15: 1147-1156.
- Badri DV, De-la-Peña C, Lei Z, Manter DK, Chaparro JM, Guimarães RL, Sumner LW, Vivanco JM.** 2012. Root secreted metabolites and proteins are involved in the early events of plant-plant recognition prior to competition. *PLOS ONE* 7: e46640.
- Bagniewska-Zadworna A, Zenktele E, Karolewski P, Zadworny M.** 2008. Phenolic compound localisation in *Polypodium vulgare* L. rhizomes after mannitol-induced dehydration and controlled desiccation. *Plant Cell Rep* 27: 1251-1259.

- Baier M, Goldberg R, Catesson AM, Francesch C, Rolando C.** 1993. Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochemistry* 32: 789-793.
- Bais HP, Park SW, Weir TL, Callaway RM, Vivanco JM.** 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci* 9: 26-32.
- Bakardjieva NT, Christova N, Christov K.** 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitive of peroxidase from mosses (*Mnium sp.*) and ferns (*Polypodium vulgare*) to high temperature. *Can J Bot* 74: 1665-1670.
- Banci L.** 1997. Structural properties of peroxidase. *J Biotechnol* 53: 253-263.
- Banks JA.** 2009. Selaginella and 400 million years of separation. *Annu Rev Plant Biol* 60: 223-238.
- Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman JL, Gribskov M, dePamphilis C, Albert VA, Aono N, Aoyama T, Ambrose BA, Ashton NW, Axtell MJ, Barker E, Barker MS, Bennetzen JL, Bonawitz ND, Chapple C, Cheng C, Correa LG, Dacre M, DeBarry J, Dreyer I, Elias M, Engstrom EM, Estelle M, Feng L, Finet C, Floyd SK, Frommer WB, Fujita T, Gramzow L, Gutensohn M, Harholt J, Hattori M, Heyl A, Hirai T, Hiwatashi Y, Ishikawa M, Iwata M, Karol KG, Koehler B, Kolukisaoglu U, Kubo M, Kurata T, Lalonde S, Li K, Li Y, Litt A, Lyons E, Manning G, Maruyama T, Michael TP, Mikami K, Miyazaki S, Morinaga S, Murata T, Mueller-Roeber B, Nelson DR, Obara M, Oguri Y, Olmstead RG, Onodera N, Petersen BL, Pils B, Prigge M, Rensing SA, Riaño-Pachón DM, Roberts AW, Sato Y, Scheller HV, Schulz B, Schulz C, Shakirov EV, Shibagaki N, Shinohara N, Shippen DE, Sørensen I, Sotooka R, Sugimoto N, Sugita M, Sumikawa N, Tanurdzic M, Theissen G, Ulvskov P, Wakazuki S, Weng JK, Willats WW, Wipf D, Wolf PG, Yang L, Zimmer AD, Zhu Q, Mitros T, Hellsten U, Loqué D, Otiillar R, Salamov A, Schmutz J, Shapiro H, Lindquist E, Lucas S, Rokhsar D, Grigoriev IV.** 2011. The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960-963.
- Bao W, O'Maley DM, Whetten R, Sederoff RR.** 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260: 672-674.
- Beck CB, Coy K, Schmidt R.** 1982. Observations on the fine structure of *Callixylon* wood. *Am J Bot* 69: 54-76.
- Belchí-Navarro S, Almagro L, Sabater-Jara AB, Fernández-Pérez F, Bru R, Pedreño MA.** 2013. Early signaling events in grapevine cells elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Plant Physiol Biochem* 62: 107-110.
- Benito B, Rodríguez-Navarro A.** 2003. A molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 36: 382-389.

- Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A, Plourde GL.** 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol* 121: 135-145.
- Berthet S, Demont-Caulet N, Pollet B, Bidzinski P, Cézard L, Le Bris P, Borrega N, Hervé J, Blondet E, Balzergue S, Lapierre C, Jouanin L.** 2011. Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Cell* 23: 1124-1137.
- Bhattacharya P, Samal AC, Majudar J, Santra SC.** 2010. Uptake of arsenic in rice plant varieties cultivated with arsenic rich groundwater. *Env Asia* 3: 34-37.
- Bi YM, Kenton P, Mur L, Darby R, Draper J.** 1995. Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J* 8: 235-245.
- Blee KA, Choi JW, O'Connell AP, Schuch W, Lewis NG, Bolwell GP.** 2003. A lignin specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry* 64: 163-176.
- Blokhina O, Violainen E, Fagerstedt KV.** 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91: 179-194.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M.** 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519-546.
- Bolwell GP, Wojtaszek P.** 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense-a broad perspective. *Physiol Mol Plant Path* 51: 347-366.
- Boudet AM, Lapierre C, Grima-Pettenati J.** 1995. Biochemistry and molecular biology of the lignification. *New Phytol* 129: 203-236.
- Boyce CK, Cody GD, Fogel ML, Hazen RM, Alexander CM, Knoll AH.** 2003. Chemical evidence for cell wall lignification and the evolution of tracheids in early devonian plants. *Int Res J Plant Sci* 164, 691-702.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248-254.
- Briceño Z, Almagro L, Sabater-Jara AB, Calderon AA, Pedreno MA, Ferrer MA.** 2012. Enhancement of phytosterols, taraxasterol and induction of extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. *J Plant Physiol* 169: 1050-1058.
- Broekaert W, Parijs J, Leyns F, Jóos H, Peumans W.** 1986. Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from tomato, apple, tobáceo and wheat. *Physiol Mol Plat Pathol* 33: 319-331.

- Brown DW.** 2011. The KP4 killer protein gene family. *Curr Genet* 57: 51-62.
- Brownleader MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin MF, Dey PM.** 1995. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiol* 109: 1115-1123.
- Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R, Ros Barceló A.** 1993. Localization of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. *Hort Sci* 28: 38-40.
- Cardinali A, Tursi N, Ligorio A, Giuffrida MG, Napolitano L, Caliandro R, Sergio L, Di-Venere D, Lattanzio V, Sonnante G.** 2011. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. *Plant Physiol Biochem* 49: 395-403.
- Carlquist S, Schneider EL.** 2000. SEM studies of vessels in ferns *Ceratopteris*. *Aquatic Botany* 66: 1-8.
- Chavez C, Flurkey WH.** 1984. Biospecific adsorption of peroxidase. *J Chromatogr* 298: 169-171.
- Chen Z, Silva H, Klessig DF.** 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1885.
- Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Montagu MV, Boerjan W.** 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol* 118: 125-135.
- Christensen JH, Overney S, Rohde A, Diaz WA, Bauw G, Simon P, Van Montagu M, Boerjan W.** 2001. The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant Mol Biol* 47: 581-593.
- Collen J, Ekdhal A, Abrahamsson K, Pedersen M.** 1994. The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. *Phytochemistry* 36: 1197-1202.
- Collins RM, Afzal M, Ward DA, Prescott MC, Sait SW, Rees HH, Tomsett AB.** 2010. Differential proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* genotypes exhibiting resistance or susceptibility to the insect herbivore, *Plutella xylostella*. *PLOS ONE* 5: e10103.
- Cortella A, Ron E, Estébanez B, Alfayate C.** 1994. On the occurrence of primary pit-field cells in the caulidia of *Hookeria lucens* (Hedw.) Sm. (Bryopsida, Bryophyta). *J Hattori Bot Lab* 77: 287-294.
- Cosgrove DJ.** 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 171-201.
- Cosio C, 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, Dunand C.** 2009. An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation through its auxin oxidase activity. *Planta* 229: 823-836.
- Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B.** 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* 328: 307-17.
- Cove D, Bezanilla M, Harries P, Quatrano R.** 2006. Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annu Rev Plant Biol* 57: 497-520.
- Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H, Penel C.** 1997. Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochem* 99: 177-186.
- Cui S, Hu J, Guo S, Wang J, Cheng Y, Dang X, Wu L, He Y.** 2012. Proteome analysis of *Physcomitrella patens* exposed to progressive dehydration and rehydration. *J Exp Bot* 63: 711-726.
- Czaninski Y, Catesson AM.** 1969. Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les tissus conducteurs végétaux au cours du cycle annuel. *J Microscopie* 8: 875-888.
- Damerval C, Devienne D, Zivy M, Thiellement H.** 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic-variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52-54.
- Daud MK, Ali S, Variath MT, Chen J, He Q, Zhu SJ.** 2013. Sugar alcohols-induced oxidative metabolism in cotton callus culture. *Afr J Biotech* 12: 2191-2200.
- Davin LB, Bedgar DL, Katayama T, Lewis NG.** 1992. On the stereoselective synthesis of (π)-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 31: 3869-3874.
- De Gara L.** 2004. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochem Rev* 3: 195-205.
- De Gara L, Locato V, Dipierro S, de Pinto MC.** 2010. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Res Physiol Neurobiol* 173S: S13-S19.
- de Marco A, Guzzardi P, Jamet E.** 1999. Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol* 120: 371-381.
- de Pinto MC, Paradiso A, Leonetti P, De Gara L.** 2006. Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant J* 48: 784-795.
- Dean JFD, Eriksson KEL.** 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48: 21-33.

- Delwiche CF, Graham LE, Thomson N.** 1989. Lignin-like compounds and sporopollenin in *Coleochaete*, an algal model for land plant ancestry. *Science* 245: 399-401.
- Dharmawardhana DP, Ellis BE, Carlson JE.** 1995. A β -glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol* 107: 331-339.
- Díaz J, Bernal A, Pomar F, Merino F.** 2001. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci* 161: 179-188
- Dihazi A, Jaiti F, Zouine J, Hassni EH, Hadrami IE.** 2003. Effect of salicylic acid on phenolic compounds related to date palm resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*. *Phytopathol Mediterr* 42: 9-16.
- Donaldson LA.** 1985. Critical assessment of interference microscopy as a technique for measuring lignin distribution in cell walls. *NZ J For Sci* 15: 349-360.
- Donaldson LA.** 2001. Lignification and lignin topochemistry—an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57: 859-873.
- Dovgan IV, Medvedeva YI.** 1983. Histochemical study of brown algae *Cystoseira barbata* Good et Wood. A.Q. of different ages. *Hydrobiological J* 18: 81-84.
- Doyle JA.** 1998. Phylogeny of vascular plants. *Ann Rev Eco System* 29: 567-599.
- Durner J, Shah J, Klessig DF.** 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 2: 266-274.
- Duroux L, Welinder K.** 2003. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J Mol Evol* 57: 397-407.
- Durst F.** 1991. Biochemistry and physiology of plant cytochrome P-450. En: *Microbial and plant cytochromes P-450. Biochemical characteristics, genetic engineering and practical implications* (K. Ruckpaul y H. Rein, Eds.). Akademie-Verlag, Berlín, 191-232.
- Eisenstadt MA, Bogolitsyn KG.** 2010. Peroxidase oxidation of lignin and its model compounds. *Bioorg Khim* 36: 802-815.
- El-baky A, Hanaa H, Amal MA, Hussein MM.** 2003: Influence of salinity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and electrophoretic patterns of protein and isoenzymes in leaves of some onion cultivars. *Asian J Plant Sci* 2: 1220-1227.
- El Mansouri I, Mercado JA, Santiago-Domenech N, Pliego-Alfaro F, Valpuesta V, Quesada MA.** 1999. Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiol Plant* 106: 355-362.

- Espiñeira JM, Novo Uzal E, Gómez Ros LV, Carrión JS, Merino F, Ros Barceló A, Pomar F.** 2011. Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants. *Plant Biol* 13: 59-68.
- Fabre N, Reiter IM, Becuwe-Linka N, Genty B, Rumeau D.** 2007. Characterization and expression analysis of genes encoding a and b carbonic anhydrases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 30: 617-629.
- Fagerstedt KV, Kukkola EM, Koistinen VV, Takahashi J, Marjamaa K.** 2010. Cell wall lignin is polymerised by class III secretable plant peroxidases in Norway spruce. *J Integr Plant Biol* 52: 186-194.
- Falleh H, Jalleli I, Ksouri R, Boulaaba M, Guyot S, Magné C, Abdelly C.** 2012. Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances. *Plant Physiol Biochem* 52:1-8.
- Fan LM, Zhao Z, Assman SM.** 2004. Guard cells: a dynamic signaling model. *Curr Opin Plant Biol* 7: 537-546
- Fernandes CF, Moraes VCP, Vasconcelos IM, Silveira JAG, Oliveira JTA.** 2006. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. *J Plant Physiol* 163:1040-1048.
- Ferrer MA, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A.** 1990. Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O₂. A model for the lignification of plant cell walls in the absence of H₂O₂. *FEBS Lett* 276: 127-130.
- Ferrer MA, Ros Barceló A.** 1994a. Genistein as an endogenous natural substrate of acidic peroxidases in lupin hypocotyls. *Ann Appl Biol* 125: 173-178.
- Ferrer MA, Ros Barceló A.** 1994b. Control of the lignification in *Lupinus* by genistein acting as superoxide scavenger and inhibitor of the peroxidase-catalyzed oxidation of coniferyl alcohol. *J Plant Physiol* 144: 64-67.
- Flurkey WH, Young LW, Jen JJ.** 1978. Separation of soybean lipoxygenase and peroxidase by hydrophobic chromatography. *J Agric Food Chem* 26: 1474-1476.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM.** 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* 100: 241–254.
- Frank W, Decker EL, Reski R.** 2005. Molecular tools to study *Physcomitrella patens*. *Plant Biol* 7: 220–227.
- Franke R, McMichael CM, Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC, Chapple C.** 2000. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5- hydroxylase. *Plant J* 22: 223-234.

- Friedman WE, Cook ME.** 2000. The origin and evolution of tracheids in vascular plants. *Philos Trans R Soc Lond* 355: 857-868.
- Fry SC.** 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 497-520.
- Fry SC.** 2004. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: Intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochem Rev* 3: 97-111.
- Fujioka S, Yokota T.** 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol* 54: 137-164.
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pedreño MA, Ros Barceló A.** 2005. Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol* 139: 1138-1154.
- Gallie DR.** 2013. L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica Article ID 795964 doi:10.1155/2013/795964*.
- Gazaryan IG, Lagrimini LM, Ashby GA, Thorneley RN.** 1996. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochem J* 313: 841-847.
- Geiger H, Fuggerer H.** 1979. Über den chemismus der Weisnerreaktion auf Lignin. *Z. Naturforsch* 34: 1471-1472.
- Gilkerson J, Perez-Ruiz JM, Chory J, Callis J.** 2012. The plastid-localized pfkB-type carbohydrate kinases FRUCTOKINASE-LIKE 1 and 2 are essential for growth and development of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 12: 102.
- Goldberg R, Liberman M, Mathieu C, Pierron M, Catesson AM.** 1987. Development of epidermal cell wall peroxidases along the mung bean hypocotyl: possible involvement in the cell wall stiffening process. *J Exp Bot* 38: 1378-1390.
- Gómez-Ros LV, Aznar-Asensio G, Hernández JA, Bernal MA, López Núñez-Flores MJ, Cuello J, Ros Barceló A.** 2007b. Structural motifs of syringyl peroxidases are conserved during angiosperm evolution. *J Agric Food Chem* 55: 4131-4138.
- Gómez-Ros LV, Gabaldón C, Pomar F, Merino F, Pedreño MA, Ros Barceló A.** 2007a. Structural motifs of syringyl peroxidases pre-date not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. *New Phytol* 173: 63-78.
- González-García MP, Rodríguez D, Nicolás C, Rodríguez PL, Nicolás G, Lorenzo O.** 2003. Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination. *Plant Physiol* 133: 135-144.

- Goud PB, Kachole MS.** 2011. Effect of exogenous hydrogen peroxide on peroxidase and polyphenol oxidase activities in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. detached leaves. *Int J Curr Res* 3: 61-65.
- Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD.** 1998. Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferylaldehyde. *J Sci Food Agric* 78: 81-87.
- Grace S, Logan BA.** 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1499-1510.
- Graham LE, Wilcox LW, Cook ME, Gensel PG.** 2004. Resistant tissues of modern marchantioid liverworts resemble enigmatic Early Paleozoic microfossils. *Proc Nat Acad Sci USA* 101: 11025-11029.
- Gray JSS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP, Montgomery R.** 1996. The glycans of soybean peroxidase. *Glycobiology* 6: 23-32.
- Green MA, Fry SC.** 2005a. Vitamin C degradation in plants via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* 433: 83-88.
- Green MA, Fry SC.** 2005b. Apoplastic degradation of ascorbate: novel enzymes and metabolites permeating the cell wall. *Plant Biosyst* 139: 2-7.
- Grisebach H.** 1981. Lignins. En "The Biochemistry of plants. A comprehensive treatise" (Conn EE, ed) Academic Press.
- Grísson R, Grezes-Besset B, Schneider M, Lucante N, Olsen L, Leguay J, Toppan A.** 1996. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing chimeric chitinase gene. *Nature Biotechnol* 14: 643-646.
- Gucciardo S, Wisniewski JP, Brewin NJ, Bornemann S.** 2006. A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. *J Exp Bot* 58: 1161-1171.
- Gunnison D, Alexander M.** 1975. Basis for the resistance of several algae to microbial decomposition. *Appl Microbiol* 29: 729-738.
- Gutiérrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, Del Río JC, Martínez AT.** 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environ Sci Technol* 41: 4124-4129.
- Helenius A, Aebi M.** 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 5512-2364.
- Hendriks T, VanLoon LC.** 1990. Petunia peroxidase a is localized in the epidermis of aerial plant organs. *J Plant Physiol* 136: 519-525.
- Henrissat B, Coutinho PM, Davies GJ.** 2001. A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 47: 55-72.

- Herrmann KM.** 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- Higuchi T.** 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol* 24: 23-63.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi, Matsui H.** 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42: 462-468.
- Hiraga S, Yamamoto K, Ito H, Sasaki K, Matsui H, Honma M, Nagamura Y, Sasaki T, Ohashi Y.** 2000. Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase gene. *FEBS Letters* 471: 245-250.
- Holm KB, Andreassen PH, Eckloff RMG, Kristensen BK, Rasmussen SK.** 2003. Three differentially expressed basic peroxidases from wound-lignifying *Asparagus officinalis*. *J Exp Bot* 54: 2275-2284.
- Hung SH, Yu CW, Lin CH.** 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot Bull Acad Sin* 46: 1-10.
- Iwasaki T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinosaki K.** 1995. Identification of a *cis* regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol Gen Genet* 247: 391-398.
- Jach G, Gormhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, IVlaas C.** 1995. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* 8: 97-109.
- Jacquet G, Pollet B, Lapierre C, Mhamdi F, Rolando C.** 1995. New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *J Agr Food Chem* 43: 2746-2751.
- Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF.** 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci* 11: 33-39.
- Jen JJ, Seo A, Flurkey WH.** 1980. Tomato peroxidase: purification via hydrophobic chromatography. *J Food Sci.* 45: 60-63.
- Jiang Y, Joyce DC.** 2003. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Reg* 39: 171-174.
- Jin Z, Matsumoto Y, Tange T, Akiyama T, Higuchi M, Ishii T, Iiyama K.** 2005. Proof of the presence of guaiacyl-syringyl lignin in *Selaginella tamariscina*. *J Wood Sci* 51: 424-426.
- Jouili H, Bouazizi H, Rossignol M, Borderies G, Jamet E, El-Ferjani E.** 2008. Partial purification and characterization of a copper-induced anionic peroxidase of sunflower roots. *Plant Physiol Biochem* 46: 760-767.

- Jun L, Xiaoming W.** 2012. Genome-wide identification, classification and expression analysis of genes encoding putative fasciclin-like arabinogalactan proteins in Chinese cabbage (*Brassica rapa L.*) Mol Biol Rep 39: 10541-10555.
- Kaida R, Serada S, Norioka N, Norioka S, Neumetzler L, Pauly M, Sampedro J, Zarra I, Hayashi T, Kaneko T.** 2010. Potential Role for purple acid phosphatase in the dephosphorylation of wall proteins in tobacco cells. Plant Physiol 153: 603-610.
- Kamal J, Amisha K, Digambar B.** 2008. Kinetic stabilities of soybean and horseradish peroxidases. Biochem Eng J 38: 110-114.
- Kärkönen A, Koutaniemi S, Mustonen M, Syrjänen K, Brunow G, Kilpeläinen I, Teeri TH, Simola LK.** 2002. Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. Physiol Plant 114: 343-353.
- Katiyar A, Smita S, Keshari S, Rajwanshi R, Chinnusamy V, Bansal KC.** 2012. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis. BMC Genomics 13: 544.
- Kaur N, Gupta A.** 2005. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. Curr Sci 10: 1771-1780.
- Kawano T, Muto S.** 2000. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. J Exp Bot 51: 685-693.
- Kawano T, Muto S, Adachi M, Hosoya H, Lapeyrie M.** 2002a. Spectronic Evidence in support of Horseradish peroxidase compound II-catalyzed oxidation of salicylic acid but not of phenylethylamine. Biosci Biotechnol Biochem 66: 651-654.
- Kawano T, Muto S, Adachi M, Hosoya H, Lapeyrie M.** 2002b. Spectronic evidence that salicylic acid converts a temporally inactivated form of Horseradish peroxidase (Compound III) to the irreversibly inactivated verdohemoprotein (P-670). Biosci Biotechnol Biochem 66: 646-650.
- Kefeli V, Kalevitch M.** 2003. Natural growth inhibitors and phytohormones in plants and environment. Borsari B (Ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kenrick P, Crane PR.** 1991. Water-conducting cells in early fossil land plants: implications for the early evolution of tracheophytes. Bot Gaz 152: 335-356.
- Kenrick P, Crane PR.** 1997. The origin and early diversification of land plants: a cladistic study. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Khuri S, Bakker FT, Dunwell JM.** 2001. Phylogeny, function and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. Mol Biol Evol 18: 593-605.

- Kim JY, Seo YS, Kim JE, Sung SK, Song KJ, An G, Kim WT.** 2001. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Sci* 161: 1145-1152.
- Kim YH, Kim CY, Song WK, Park DS, Kwon SY, Lee HS, Bang JW, Kwak SS.** 2008. Overexpression of sweet potato swpa4 peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. *Planta* 227: 867-881.
- Kizis D, Lumberras V, Pages M.** 2001. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Lett* 498: 187-189.
- Knight CD, Sehgal A, Atwal K, Wallace JC, Cove DJ, Coates D, Quatrano RS, Bahadur S, Stockley PG, Cuming AC.** 1995. Molecular responses to abscisic acid and stress are conserved between moss and cereals. *Plant Cell* 7: 499-506.
- Kobayashi T, Taguchi H, Shigematsu M, Tanahashi M.** 2005. Substituent effects of 3,5-disubstituted *p*-coumaryl alcohols on their oxidation using horseradish peroxidase-H₂O₂ as the oxidant. *J Wood Sci* 51: 607-614.
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S.** 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: 635-644.
- Koornneef M, Leon-Kloosterziel KM, Schwartz SH, Zeevaart JAD.** 1998. The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Bioch* 36: 83-89.
- Koutaniemi S, Toikka MM, Kärkönen A, Mustonen M, Lundell T, Simola LK, Kilpeläinen IA, Teeri TH.** 2005. Characterization of basic *p*-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture. *Plant Mol Biol* 58: 141-157.
- Kranz R, Richard-Fogal C, Taylor JS, Frawley ER.** 2009. Cytochrome c biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 510-528.
- Kremer C, Pettolino F, Bacic A, Drinnan A.** 2004. Distribution of cell wall components in *Sphagnum hyaline* cells and in liverwort and hornwort elater. *Planta* 219: 1023-1035.
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ.** 1998. Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiol* 118: 849-860.
- Kroemer K, Reski R, Frank W.** 2004. Abiotic stress response in the moss *Physcomitrella patens*: evidence for an evolutionary alteration in signaling pathways in land plants. *Plant Cell Rep* 22: 864-870.

- Kroken SB, Graham LE, Cook ME.** 1996. Occurrence and evolutionary significance of resistant cell walls in charophytes and bryophytes. *Am J Bot* 83: 1241-1254.
- Kvaratskhelia M, Winkel C, Thorneley RNF.** 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol* 114: 1237-1245.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothstein S.** 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis y tissue-specific expression. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 7542-7546.
- Lagrimini LM, Gingas V, Finger F, Rothstein S, Liu TY.** 1997. Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiol* 114: 1187-1196.
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL.** 1998. *Plant physiological ecology*. Springer.
- Lederkremer GZ, Cheng Y, Petre BM, Vogan E, Springer S, Schekmani R, Walz T, Kirchhausen T.** 2001. Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. *Proc Nat Acad Sci USA* 98: 10704-10709.
- Lehtonen MT, Akita M, Kalkkinen N, Ahola-Iivarinen E, Rönholm G, Somervuo P, Thelander M, Valkonen JP.** 2009. Quickly-released peroxidase of moss in defense against fungal invaders. *New Phytol* 183: 432-43.
- Leon J, Lawton MA, Raskin I.** 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 108: 1673-1678.
- Leung J, Giraudat J.** 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 199-222.
- Lewis NG, Davin LB.** 2000. Phenolic coupling in plants: Dirigent proteins, dirigent sites and notions beyond randomness. Part 1. *Polyphénols Actualités* 20: 18-25.
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J.** 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272: 398-401.
- Li L, Popko JL, Umezawa T, Chiang VL.** 2000. 5-hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J Biol Chem* 275: 6537-6545.
- Li X, Chapple C.** 2010. Understanding lignification: challenges beyond monolignol biosynthesis. *Plant Physiol* 154: 449-452.
- Li Y, Kajita S, Kawai S, Katayama Y, Morohoshi N.** 2003. Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. *J Plant Res* 116: 175-182.

- Li Z, Zhao X, Sandhu AK, Gu L.** 2010. Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. *J Agric Food Chem* 58: 6503-6509.
- Ligrone R, Carafa A, Duckett JG, Renzaglia KS, Ruel K.** 2008. Immunocytochemical detection of lignin-related epitopes in cell walls in bryophytes and the charalean green alga *Nitella*. *Plant Syst Evol* 270: 257-272.
- Ligrone R, Duckett JG, Renzaglia KS.** 2000. Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 795-813.
- Ligrone R, Vaughn KC, Renzaglia KS, Knox JP, Duckett JG.** 2002. Diversity in the distribution of polysaccharide and glycoprotein epitopes in the cell walls of bryophytes: new evidence for the multiple evolution of water-conducting cells. *New Phytol* 156: 491-508.
- Lin CC, Kao CH.** 2001a. Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Sci* 160: 323-329.
- Lin CC, Kao CH.** 2001b. Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. *Plant Soil* 230: 135-143.
- Liszakay A, Kenk B, Schopfer P.** 2003. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* 217: 658-667.
- Liszakay A, Van der Zalm E, Schopfer P.** 2004. Production of reactive oxygen intermediates ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , and OH^{\cdot}) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* 136: 3114-3123.
- Loake G, Grant M.** 2007. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* 10: 466-472.
- Logan KJ, Thomas BA.** 1985. Distribution of lignin derivatives in plants. *New Phytol* 99: 571-585.
- López-Delgado H, Datt JF, Foyer HC, Scott I.** 1998a. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic and H_2O_2 . *J Exp Bot* 49: 713-720.
- López-Delgado H, Jiménez-Casas M, Scott I.** 1998b. Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetyl salicylic acid. *Plant Cell Tiss Org Cult* 54: 145-152.
- López-Delgado H, Zavaleta-Mancera HA, Mora-Herrera ME, Vázquez-Rivera M, Flores-Gutiérrez FX, Scott I.** 2005. Hydrogen peroxide increases potato tuber and stem starch content, stem diameter, and stem lignin content. *Am J Potato Res* 82: 279-285.

- López-Molina D, Heering HA, Smulevich G, Tudela J, Thorneley RNF, García-Cánovas F, Rodríguez-López JN.** 2003. Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L. *J Inorg Biochem* 94: 243-254.
- López-Serrano M, Fernández MD, Pomar F, Pedreño MA, 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.
- Maldonado AM, Echevarria-Zomeno S, Jean-Baptiste S, Hernandez M, Jorriñ-Novó JV.** 2008. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *J Proteomics* 71: 461-72.
- Marjamaa K, Hildén K, Kukkola E, Lehtonen M, Holkeri H, Haapaniemi P, Koutaniemi S, Teeri TH, Fagerstedt K, Lundell T.** 2006. Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in lignifying xylem of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol Biol* 61: 719-732.
- Marjamaa K, Kukkola EM, Fagerstedt KV.** 2009. The role of xylem class III peroxidases in lignification. *J Exp Bot* 60: 367-376.
- Martone PT, Estevez JM, Lu F, Ruel K, Denny MW, Somerville C, Ralph J.** 2009. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Current Biol* 19: 169-175.
- Matlok J, Krzakowa M, Rudolph H.** 1989. Peroxidase patterns in Bryophytes: a critical evaluation. *J Hattori Bot Lab* 67: 407-414.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T.** 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combination of chitinases and p-1,3-glucanases. *Plant Physiol* 88: 936-942.
- Mauseth JD.** 1988. *Plant anatomy*. Benjamin Cummings, Menlo Park, Calif. 794 pp.
- McDougall GJ.** 1992. Changes in the cell wall associated peroxidases during the lignification of flax fibers. *Phytochemistry* 31: 3385-3389.
- McDougall GJ, Morrison IM.** 1996. Extraction and partial purification of cell wall-associated coniferyl alcohol oxidase from developing xylem of Sitka spruce. *Holzforschung* 50: 549-553.
- McMannus MT, Ashford DA.** 1997. Glycosylation of plant peroxidases. *Plant Perox Newslett* 10: 15-23.
- Michalak A.** 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol J Environ Stud* 15: 523-530.
- Mika A, Lüthje S.** 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol* 132: 1489-1498.

- Miksche GE, Yasuda S.** 1978. Lignin of 'giant' mosses and some related species. *Phytochemistry* 17: 503-504.
- Minami A, Nagao M, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D.** 2003. Abscisic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *J Plant Physiol* 160: 475-483.
- Minami A, Nagao M, Ikegami K, Koshiba T, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D.** 2005. Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. *Planta* 220: 414-423.
- Mishler BD, Churchill SP.** 1984. A cladistic approach to the phylogeny of the "bryophytes". *Brittonia* 36: 406-424.
- Miyakawa T, Miyazono K, Sawano Y, Hatano Tanokura M.** 2009. Crystal structure of ginkbilobin-2 with homology to the extracellular domain of plant cysteine-rich receptor-like kinases. *Proteins* 77: 247-251.
- Mohan R, Bajar AM, Kolattukudy PE.** 1993. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (tap 1) by wounding in transgenic tobacco and activation of tap1/GUS and tap2/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding in pathogen attack. *Plant Mol Biol* 12: 341-354.
- Møller SG, McPherson MJ.** 1998. Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis* atao1 gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *Plant J.* 13: 781-91.
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, Uknes S, Kessmann H, Ryals J.** 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J* 8: 227-233.
- Nielsen KL, Indiani C, Henriksen A, Feis A, Becucci M, Gajhede M, Smulevich G, Welinder KG.** 2001. Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. *Biochemistry* 40: 11013-11021.
- Niklas KJ.** 1984. Size-related changes in the primary xylem anatomy of some early tracheophytes. *Paleobiology* 10: 487-506.
- Niklas KJ.** 1985. The evolution of tracheid diameter in early vascular plants and its implications on the hydraulic conductance of the primary xylem strand. *Evolution* 39: 1110-1122.
- Niklas KJ.** 1990. Biomechanics of *Psilotum nudum* and some early Paleozoic vascular sporophytes. *Am J Bot* 77: 590-606.
- Niklas KJ.** 1994. The allometry of safety factors for plant height. *Am J Bot* 81: 345-351.

- Niklas KJ.** 1997. The evolutionary biology of plants. UC Press.
- Nose M, Bernards MA, Furlan M, Zajicek J, Eberhardt TL, Lewis NG.** 1995. Towards the specification of consecutive steps in macro-molecular lignin assembly. *Phytochemistry* 39: 71-79.
- Novo-Uzal E, Gómez Ros LV, Hernández JÁ, Pedreño MA, Cuello J, Ros Barceló A.** 2009b. Analysis of the soluble cell wall proteome of gymnosperms. *J Plant Physiol* 166: 831-843.
- Novo-Uzal E, Gómez Ros LV, Pomar F, Bernal MA, Paradela A, Albar JP, Ros Barceló A.** 2009a. The presence of sinapyl lignin in *Ginkgo biloba* cell cultures changes our views of the evolution of lignin biosynthesis. *Physiol Plant* 135: 196-213.
- Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR.** 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105: 361-363.
- Ogawa K, Kanematsu S, Asada K.** 1997. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol* 38: 1118-1126.
- Oliver MJ.** 1996. Desiccation tolerance in vegetative plant cells. *Physiol Plant* 97: 779-787.
- Osakabe K, Koyama H, Kawai S, Katayama Y, Morohoshi N.** 1994. Molecular cloning and the nucleotide sequences of two novel cDNAs that encode anionic peroxidases of *Populus kitakammiensis*. *Plant Sci* 103: 167-175.
- Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP, Chang VL.** 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 8955-8960.
- Østergaard L, Teilum K, Mirza O, Mattsson O, Petersen M, Welinder KG, Mundy J, Gajhede M, Henriksen A.** 2000. *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol Biol* 44: 231-243.
- Ozden M, Demirel U, Kahraman.** 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Sci Hortic* 119: 163-168.
- Pak C, Van Doorn WG.** 2005. Delay of Iris flower senescence by protease inhibitors. *New Phytol* 165: 473-480.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C.** 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. *Plant Cell Rep* 24: 255-265.
- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C.** 2004. The plant peroxidase multigenic family in rice and its evolution in green plants. *Phytochemistry* 65: 1879-1893.

- Passardi F, Theiler G, Zamocky M, Cosio C, Rouhier N, Teixeira F; Margis-Pinheiro M, Ioannidis V, Penel C, Falquet L, Dunand C. PeroxiBase: The peroxidase database. 2007. *Phytochemistry* 68: 1605-1611.
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev IV, Lyons E, Maher CA, Martis M, Narechania A, Ollilar RP, Penning BW, Salamov AA, Wang Y, Zhang L, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboob-ur-Rahman Ware D, Westhoff P, Mayer KF, Messing J, Rokhsar DS. 2009. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551-556.
- Pedreño MA, Bernal MA, Calderón AA, Ferrer MA, López-Serrano M, Merino de Cáceres F, Muñoz R, Ros Barceló A. 1993. A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in *Vitaceae*, *Solanaceae* y *Leguminosae*. *Plant Peroxidases: Biochem Physiol*. Ed. KJ Welinder, SK Rasmussen, C Penel y H Greppin, Universidad de Ginebra, Ginebra. 307-314.
- Peter G, Neale D. 2004. Molecular basis for the evolution of xylem lignification. *Curr Opin Plant Biol* 7: 737-742.
- Pnueli L, Liang H, Rozenberg M, Mittler R. 2003. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx 1) –deficient *Arabidopsis* plants. *Plant J* 34: 187-203.
- Polle A, Otter T, Seifert F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol* 106: 53-60.
- Polyakov NB, Slizhikova DK, Izmalkova MYu, Cherepanova NI, Kazakov VS, Rogova MA, Zhukova NA, Alexeev DG, Bazaleev NA, Skripnikov AY, Govorun VM. 2010. Proteome Analysis of Chloroplasts from the Moss *Physcomitrella patens* (Hedw.). *B.S.G. Biochem Moscow* 75: 1470-1483.
- Pomar F, Caballero N, Pedreño MA, Ros Barceló A. 2002. H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS Lett* 529: 198-202.
- Ponce de León I, Schmelz EA, Gaggero C, Castro A, Álvarez A, Montesano M. 2012. *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Mol Plant Pathol* 13: 960-974.
- Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van De Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic Res* 36: 217-233.

- Quiroga AM, Deis L, Cavagnaro JB, Bottini R, Silva MF.** 2012. Water stress and abscisic acid exogenous supply produce differential enhancements in the concentration of selected phenolic compounds in Cabernet Sauvignon. *J Berry Res* 2: 33-44.
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Ros Barceló A, Amaanda I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier H, Valpuesta V.** 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1127.
- Radic S, Radic-Stojkovic M, Pevalsek-Kozlina B.** 2006. Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. *J Plant Physiol* 163: 1284-1292.
- Ragan MA.** 1984. *Fucus* "lignin": a reassessment. *Phytochemistry* 23: 2029-2032.
- Ragan MA, Glombitza KW.** 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog Phycol Res* 4: 129-241.
- Ralph J, Bunzel M, Marita JM, Hatfield RD, Lu F, Kim H, Schatz PF, Grabber JH, Steinhart H.** 2004. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem Rev* 3: 79-96.
- Ralph J, Peng J, Lu F, Hatfield RD, Helm RF.** 1999. Are lignins optically active? *J Agr Food Chem* 47: 2991-2996.
- Ralph S, Park JY, Bohlmann J, Mansfield SD.** 2006. Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound- and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea* spp.) *Plant Mol Biol* 60: 21-40.
- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet AM, Goffner D.** 2002. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol* 129: 145-155.
- Raven JA.** 1984. Physiological correlates of the morphology of early vascular plants. *Bot J Linn Soc* 88: 105-126.
- Raven JA.** 1987. The evolution of vascular land plants in relation to supracellular transport processes. *Adv Bot Res* 5: 153-219.
- Rensing SA, Kiessling J, Reski R, Decker EL.** 2004. Diversification of *ftsZ* during early land plant evolution. *J Mol Evol* 58: 154-162.
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A,**

- Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Jeffrey L, Boore JL. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Reski R, Frank W. 2005. Moss (*Physcomitrella patens*) functional genomics- Gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health. *Brief Funct Gen Prot* 4: 48-57
- Reyes FL, Villareal JE, Cisneros-Zevallos L. 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chem* 101: 1254-1262.
- Reznicov VM, Mikhaseva MF, Zilbergleit MA. 1978. The lignin of the alga *Fucus vesiculosus*. *Chem Nat Compounds* 14: 554-556.
- Richardt S, Timmerhaus G, Lang D, Qudeimar E, Corrêa LGG, Reski R, Rensing SA, Frank W. 2010. Microarray analysis of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionarily conserved transcriptional regulation of salt stress and abscisic acid signaling. *Plant Mol Biol* 72: 27-45.
- Rivas SanVicente M, Plasencia J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role on plant growth and development. *J Exp Bot.* 62: 3321-3338.
- Ros Barceló A. 1995. Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma* 186: 41-44.
- Ros Barceló A. 1997. Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* 176: 87-132.
- Ros Barceló A. 1998a. Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Ann Bot* 82: 97-103.
- Ros Barceló A. 1998b. 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, Ferrer MA, García-Florenciano E, Muñoz R. 1991. The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pl in *Lupinus*. *Bot Acta* 104: 272-278.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Esteban-Carrasco A. 2007. Looking for syringyl peroxidases. *Trends Plant Sci* 12: 486-491.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Ferrer MA, 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, Pedreño MA. 2004. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? *Phytochem Rev* 3: 61-78.

- Ros Barceló A, Morales M, Pedreño MA.** 1997. Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. Lignin and Lignan Biosynthesis, N.G. Lewis and S. Sarkanen, eds, ACS Symposium Series, ACS, Washington 697: 84-95.
- Ros Barceló A, Muñoz R.** 1989. Epigenetic control of a cell wall scopoletin peroxidase by lupisoflavone in *Lupinus*. *Phytochemistry* 28: 1331-1333.
- Ros Barceló A, Muñoz R, Sabater F.** 1987. Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell wall bound isoperoxidase activity. *Physiol Plant* 71: 448-454.
- Ros Barceló A, Muñoz R, Sabater F.** 1988. Lupin peroxidases III. Subcellular location of membrane-bound acidic isoperoxidases. *Plant Physiol Biochem* 26: 575-583.
- Ros Barceló A, Pomar F.** 2001. Oxidation of cinnamyl and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. *Phytochemistry*. 57: 1105-1113.
- Ros Barceló A, Pomar F, López-Serrano M, Martínez P, Pedreño MA.** 2002. Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiol Biochem* 40: 325-332.
- Ros Barceló A, Pomar F, 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.
- Roth-Nebelsick A, Grimm G, Mosbrugger V, Hass H, Kerp H.** 2000. Morphometric analysis of *Rhynia* and *Asteroxylon*: testing functional aspects of early land plant evolution. *Paleobiology* 26: 405-418.
- Ryan JB, Ó'Fágáin C.** 2007. Arginine-to-lysine substitutions influence recombinant horseradish peroxidase stability and immobilisation effectiveness. *BMC Biotech* 7: 86.
- Sabater-Jara AB, Almagro A, Belchí-Navarro S, Ferrer MA, Ros-Barceló A, Pedreño MA.** 2010. Induction of sesquiterpenes, phytoesters and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited cell cultures of *Capsicum annuum*. *J Plant Physiol* 167: 1273-1281.
- Sáez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R, Rodriguez PL.** 2006. Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol* 141: 1389-1390.
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M.** 2004. *Arabidopsis* CYP707as encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol* 134: 1439-1449.

- Sarnighausen E, Wurtz V, Heintz D, Dorsselaer AV, Reski R.** 2004. Mapping of the *Physcomitrella patens* proteome. *Phytochemistry* 65: 1589-1607.
- Sasaki S, Baba K, Nishida T, Tsutsumi Y, Kondo R.** 2006. The cationic cell-wall-peroxidase having oxidation ability for polymeric substrate participates in the late stage of lignification of *Populus alba* L. *Plant Mol Biol* 62: 797-807.
- Sato K, Nishikubo N, Mashino Y, Yoshitomi K, Zhou J, Kajita S, Katayama Y.** 2009. Immunohistochemical localization of enzymes that catalyze the long sequential pathways of lignin biosynthesis during differentiation of secondary xylem tissues of hybrid aspen (*Populus sieboldii* x *Populus grandidentata*). *Tree Physiol* 29: 1599-1606.
- Sato Y, Sugiyama M, Komamine A, Fukuda H.** 1995. Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. *Planta* 196: 141-147.
- Scheirer DC.** 1980. Differentiation of bryophyte conducting tissues: structure and histochemistry. *Bull Torrey Bot Club* 107: 298-307.
- Schlesier B, Berna A, Bernier F, Mock HP.** 2004. Proteome analysis differentiates between two highly homologous germin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Ws-2. *Phytochemistry* 65: 1565-1574.
- Schneider EL, Carlquist S.** 2000. SEM studies on vessels of the homophyllous species of Selaginella. *Int J Plant Sci* 161: 967-974.
- Sergio L, Cardinali A, Di Paola A, Di Venere D.** 2009. Biochemical properties of soluble and bound peroxidases from artichoke heads and leaves. *Food Technol Biotech* 47: 32-38.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M.** 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1: 2856-2860.
- Shigeoka S, Nakano Y, Kitakoa S.** 1980. Purification and properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis*. *Z Arch Biochem Biophys* 201: 121-127.
- Siegel BZ.** 1993. Plant peroxidases-an organismic perspective. *Plant Growth Regul* 12: 303-312.
- Siegel SM.** 1969. Evidence for the presence of lignin in moss gametophytes. *Am J Bot* 56: 175-179.
- Singleton VL, Rossi JA.** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticul* 16: 144-158.
- Small ID, Peeters N.** 2000. The PPR motif-a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *TIBS*: 25: 46-47.

- Snider J, Thibault G, Houry WA.** 2008. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol* 9: 216.
- Sørensen I, Pettolino FA, Bacic A, Ralph J, Lu F, O'Neill MA, Fei Z, Rose JK, Domozych, DS, Willats WG.** 2011. The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *Plant J* 68: 201-211.
- Sottomayor M, Ros Barceló A.** 1997. What can we learn from α -3', 4'-anhydrovinblastine synthase? *Recent Res Devel Phytochem* 1: 225-233.
- Speck T, Vogellehner D.** 1988. Biophysical examinations of the bending stability of various stele types and the upright axes of early 'vascular' land plants. *Bot Acta* 101: 262-268.
- Sperry JS.** 2003. Evolution of water transport and xylem structure. *Int J Plant Sci* 164: 115-127.
- Spoel SH, Mou ZL, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong XNA.** 2009. Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* 137: 860-872.
- Stein W.** 1993. Modeling the evolution of stellar architecture in vascular plants. *Int J Plant Sci* 154: 229-263.
- Summermatter K, Sticher L, Metraux JP.** 1995. Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol* 108: 1379-85.
- 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.
- Talas-Ogras T, Kazan K, Gözükmizi N.** 2001. Decreased peroxidase activity in transgenic tobacco and its effect on lignification. *Biotech Lett* 23: 267-273.
- Terashima N, Fukushima K.** 1989. Biogenesis and structure of macromolecular lignin in cell wall of tree xylem as studied by microautoradiography. "Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation" (Lewis NG, Paice, eds) ACS Symp Series, ACS, Washington DC 399: 160-168.
- Thelander M, Olsson T, Ronne H.** 2004. Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO J* 23: 1900-1910.
- Thompson J, Higgins D, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Thomson JE, Ledge RL, Barber RF.** 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol* 105: 312-344.

- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P.** 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.
- Tsai YC, Kao CH.** 2004. The involvement of hydrogen peroxide in abscisic acid-induced activities of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in rice roots. *Plant Growth Reg* 43: 207-212.
- Tsutsumi Y, Nishida T, Sakai K.** 1994. Lignin biosynthesis in woody angiosperm tissues III. Isolation of substrate-specific peroxidases related to the dehydrogenative polymerization of sinapyl and coniferyl alcohols from *Populus* callus cultures. *Mokuzai Gakkaishi* 40: 1348-1354.
- Vanden Driessche T, Kevers C, Gaspar T, Caubergs R.** 1984. Peroxidases in *Acetabularia*: their possible role in development. *Differentiation* 27: 175-181.
- Vannini C, Marsoni M, Cantara C, de Pinto MC, Locato V, De Gara L, Bracale M.** 2012. The soluble proteome of tobacco Bright Yellow-2 cells undergoing H₂O₂-induced programmed cell death. *J Exp Bot* 63: 3137-3155.
- Van Loon LC, Van Strien EA.** 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55: 85-97.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W.** 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* 153: 895-905.
- Veitch NC.** 2004. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochem Rev* 3: 3-18.
- Veljovic-Jovanovic S, Kukavica B, Stevanovic B, Navari-Izzo F.** 2006. Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *J Exp Bot* 57: 1759-1768.
- Verzelloni E, Tagliacruzchi D, Conte A.** 2007. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chem* 105: 564-571.
- Vincent JFV, Jeronimidis G.** 1991. The mechanical design of fossil plants. In *Biomechanics and evolution* (JMV. Rayner and RJ Wootten, eds.), pp. 21-36. CUP, Cambridge, UK.
- Vitali A, Botta B, Monache GD, Zappitelli S, Ricciardi P, Melino S, Petruzzelli R, Giardina B.** 1998. Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies. *Biochem J* 331: 513-519.
- Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF.** 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Ann Rev Phytopath* 47: 177-206

- Watanabe L, Moura PR, Bleicher L, Nascimento AS, Zamorano LS, Calvete JJ, Sanz L, Perez A, Bursakov S, Roig MG, Shnyrov VL, Polikarpov I.** 2010. Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *J Struct Biol* 169: 226-242.
- Weger HG.** 1997. Interactions between Cu(II), Mn(II) and salicylhydroxamic acid in determination of algal peroxidase activity. *Phytochemistry* 46: 195-201.
- Welinder KG.** 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, Duroux L.** 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 269: 6063-6081.
- Wen F, Zhu F, Hawes MC.** 1999. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* 11: 1129-1140.
- Weng JK, Akiyama A, Bonawitz ND, Li X, Ralph J, Chapple C.** 2010. Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte *Selaginella* and flowering plants. *Plant Cell* 22: 1033-1045
- Weng JK, Akiyama T, Ralph J, Chapple C.** 2011. Independent recruitment of an O-methyltransferase for syringyl lignin biosynthesis in *Selaginella moellendorffii*. *Plant Cell* 23: 2708-24.
- Weng JK, Chapple C.** 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol* 187: 273-285.
- Weng JK, Li X, Stout J, Chapple C.** 2008. Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 105: 7887-7892.
- Whetten R, Sederoff RR.** 1995. Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-1013.
- Wight DC.** 1987. Non-adaptative change in early land plant evolution. *Paleobiology* 13: 208-214.
- Willis KJ, McElwain JC.** 2002. The evolution of plants. Oxford Univ Press, New York.
- Wilson IBH.** 2002. Glycosilation of proteins in plants and invertebrates. *Curr Opin Struct Biol* 12: 569-577.
- Wrigley CW.** 1971. Gel electrofocusing. *Method Enzimol* 22: 55-564.
- Xiao-liang X, Shu-ju N, Xia J, Xiao-gui G, Ren-lei Z, Dao-zhi W.** 2010. Protein extraction methods for two-dimensional electrophoresis from *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek Leaves - A medicinal plant with high contents of interfering compounds. *Agr Sci China* 9: 1530-1537.

- Xu Z, Zhang D, Hu J, Zhou X, Ye X, Reichel KL, Stewart NR, Syrenne RD, Yang X, Gao P, Shi W, Doeppke C, Sykes RW, Burris JN, Bozell JJ, Cheng MZ, Hayes DG, Labbe N, Davis M, Stewart CN, Yuan JS.** 2009. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics* 10, Suppl 11:S3.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 57: 781-803.
- Yang BY, Gray JSS, Montgomery R.** 1996. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Res* 287: 203-212.
- Yu CW, Murphy TM, Lin CH.** 2003. Hydrogen peroxide induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. *Funct Plant Biol* 30: 955- 963.
- Yu CW, Murphy TM, Sung W, Lin CH.** 2002. H₂O₂ treatment induces glutathione accumulation and chilling tolerance in mung bean. *Funct Plant Biol* 29: 1081-1087.
- Zapprometov M.** 1989. The formation of phenolic compounds in plant cell and tissue cultures and possibility of its regulation. *Adv Cell Cult* 7: 240-245.
- Zheng W, Wang SY.** 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49: 5165-5170.

