

# **Caracterización funcional de la última etapa de la biosíntesis de ligninas mediante la sobreexpresión de peroxidasas en plantas modelo**

Autora: Alba García Ulloa

---

Tese de doutoramento UDC / 2018

Directores: Federico Pomar Barbeito e Esther Novo Uzal

Titor: Federico Pomar Barbeito

Programa de doutoramento en Bioloxía Celular e Molecular





D. **FEDERICO POMAR BARBEITO**, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA Y DÑA. **ESTHER NOVO UZAL**, INVESTIGADORA POSDOCTORAL EN EL INSTITUTO GULBENKIAN DE CIÊNCIA (PORTUGAL),

**DECLARAN:**

Que la siguiente memoria, titulada “**Caracterización funcional de la última etapa de la biosíntesis de ligninas mediante la sobreexpresión de peroxidasas en plantas modelo**”, presentada por Dña. **ALBA GARCÍA ULLOA** , ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña, dentro del Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular, y cumple con las condiciones exigidas para ser defendido ante el tribunal que lo deberá juzgar y optar al grado de Doctora con Mención Internacional.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en A Coruña a \*\* de septiembre de 2018.

Dr. Federico Pomar Barbeito

Dra. Esther Novo Uzal



El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña. Durante la realización del mismo, la firmante estuvo contratada con financiación procedente de una ayuda de apoyo a la etapa predoctoral del Plan Gallego de Investigación, Innovación y Crecimiento 2011-2015 (Plan I2C) de la Consellería de Cultura, Educación y Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia (PRE/2013/280) y una ayuda para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad (2013-2016) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU13/04835).

Parte de este trabajo también se realizó en la Università Campus Bio-Medico di Roma (Italia) en una estancia predoctoral financiada con las ayudas del Programa de Becas de Posgrado en el Extranjero de la Fundación Barrié.



## Resumen

Las ligninas son polímeros amorfos e impermeables que se forman por la polimerización oxidativa de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos. Se depositan en la pared celular junto con celulosa y xilanos para formar la pared secundaria de algunos tipos celulares en tejidos como el xilema. En la última etapa de su biosíntesis participan peroxidasas de clase III, difíciles de identificar por el gran número de isoformas que presentan las plantas y las múltiples funciones que pueden desempeñar. En este trabajo *ZePrx*, una peroxidasa de *Zinnia elegans* Jacq. relacionada previamente con la lignificación, se sobreexpresó en plantas de tabaco para caracterizar su efecto sobre la pared, los sistemas antioxidantes y la expresión génica. Los resultados obtenidos muestran que esta enzima permite alterar el ratio S/G de las ligninas y los polisacáridos de pared, sin causar alteraciones en el desarrollo vascular, vegetativo y reproductivo de las plantas. Esta sobreexpresión también desencadenó cambios en el ciclo ascorbato-glutatión, sugiriendo un posible papel de esta enzima en las respuestas a estrés. Además, da lugar a la regulación de múltiples genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria, lo que apoya su participación en la formación de la misma.

## Resumo

As ligninas son polímeros amorfos e impermeables que se forman pola polimerización oxidativa de tres alcois *p*-hidroxicinamílicos. Deposítanse na parede celular xunto con celulosa e xilanos para formar a parede secundaria dalgúns tipos celulares en tecidos como o xilema. Na última etapa da súa biosíntese participan peroxidasas de clase III, difíciles de identificar polo grande número de isoformas que presentan as plantas e as múltiples funcións que poden desempeñar. Neste traballo *ZePrx*, unha peroxidasa de *Zinnia elegans* Jacq. relacionada previamente coa lignificación, sobreexpresouse en plantas de tabaco para caracterizar o seu efecto sobre a parede, os sistemas antioxidantes e a expresión xénica. Os resultados obtidos mostran que esta enzima permite alterar o ratio S/G das ligninas e os polisacáridos de parede, sen causar alteracións no desenvolvemento vascular, vexetativo e reproductivo

das plantas. Esta sobreexpresión tamén provocou cambios no ciclo ascorbato-glutación, suxerindo un posible papel de esta enzima nas respostas a estrés. Ademais, dá lugar á regulación de múltiples xenes implicados na biosíntese da parede secundaria, o que apoia a súa participación na formación da mesma.

### **Abstract**

Lignins are amorphous hydrophobic polymers that are synthesized by oxidative polymerization of three *p*-hydroxycinnamyl alcohols. Lignins, cellulose and xylan are synthesized to form the secondary cell wall of some cell types in tissues like xylem. The last step of lignins biosynthesis is catalysed by class III peroxidases. These enzymes are hard to identify because plants present a great number of isoforms that are involved in diverse functions. In this work *ZePrx*, a *Zinnia elegans* Jacq. peroxidase previously related with lignification, was overexpressed in tobacco plants to characterize its effect on the cell wall, antioxidant systems and gene expression. The obtained results show that this enzyme is able to alter lignin S/G ratio and, as a consequence, cell wall polysaccharides without changing vascular, vegetative and reproductive development of tobacco plants. This overexpression also lead to changes in the ascorbate-glutathione cycle, suggesting a possible role of this enzyme in stress response. Besides, the overexpression of *ZePrx* caused the regulation of multiple genes involved in secondary cell wall formation, which supports its participation in this process.



## ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	xi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Pared celular vegetal</b> .....	<b>3</b>
1.1. <i>Estructura y composición de la pared vegetal</i> .....	3
1.1.1. <u>Composición de la pared primaria</u> .....	4
<i>Celulosa</i> .....	5
<i>Glucanos de entrecruzamiento</i> .....	6
<i>Pectinas</i> .....	6
<i>Proteínas</i> .....	7
1.1.2. <u>Composición de la pared secundaria</u> .....	7
<i>Celulosa</i> .....	7
<i>Glucanos de entrecruzamiento</i> .....	9
<i>Ligninas</i> .....	9
1.2. <i>Control de la formación de la pared secundaria</i> .....	10
1.2.1. <u>Control transcripcional de la formación de la pared secundaria</u> .....	11
<b>2. Lignificación</b> .....	<b>14</b>
2.1. <i>Funciones de las ligninas</i> .....	15
2.2. <i>Biosíntesis de las ligninas</i> .....	16
2.2.1. <u>Biosíntesis de monolignoles</u> .....	16
<i>Metabolismo del ácido sikímico</i> .....	17
<i>Ruta fenilpropanoide</i> .....	17
<i>Ruta específica de los monolignoles</i> .....	17
2.2.2. <u>Transporte de monolignoles a la pared</u> .....	19
2.2.3. <u>Enzimas implicadas en la oxidación de monolignoles</u> .....	20
2.2.4. <u>Polimerización oxidativa</u> .....	21
2.2.5. <u>Factores que contribuyen a la complejidad de las ligninas</u> .....	24
2.3. <i>Diversidad en la composición de las ligninas</i> .....	25
2.4. <i>Relevancia económica de la lignificación</i> .....	26
<b>3. Peroxidasas</b> .....	<b>27</b>
3.1. <i>Clasificación</i> .....	27
3.2. <i>Control de los niveles de ROS</i> .....	29
3.3. <i>Peroxidasas de clase III</i> .....	31
3.3.1. <u>Estructura génica y proteica</u> .....	31

3.3.2. <u>Mecanismo de acción y reacciones</u> .....	34
3.3.3. <u>Diversidad de funciones</u> .....	36
<i>Papel en la lignificación</i> .....	38
3.3.4. <u>Estrategias para determinar la función de cada isoenzima</u> .....	42
<b>4. La implicación de la peroxidasa básica de <i>Zinnia elegans</i> Jacq. en la lignificación</b>	<b>44</b>
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
<b>1. Obtención de vectores para la transformación de <i>Nicotiana tabacum</i> L.</b> .....	<b>55</b>
1.1. <i>Material vegetal</i> .....	55
1.2. <i>Extracción de RNA y obtención de cDNA del gen ZePrx</i> .....	55
1.3. <i>Obtención de células competentes de Escherichia coli</i> .....	56
1.4. <i>Obtención del vector de entrada pJIT62</i> .....	57
1.4.1. <u>Transformación de las células de <i>E. coli</i></u> .....	57
1.4.2. <u>Cribado de las colonias</u> .....	58
1.4.3. <u>Obtención del vector</u> .....	58
1.5. <i>Obtención del plásmido pGreen II 0179</i> .....	59
1.5.1. <u>Transformación de células de <i>E. coli</i></u> .....	60
1.5.2. <u>Cribado de las colonias</u> .....	60
1.5.3. <u>Obtención del vector</u> .....	61
1.5.4. <u>Secuenciación</u> .....	61
<b>2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> .....	<b>61</b>
<b>3. Obtención de plantas transformantes</b> .....	<b>62</b>
3.1. <i>Obtención de material vegetal</i> .....	62
3.2. <i>Transformación de N. tabacum</i> .....	62
3.2.1. <u>Precultivo</u> .....	63
3.2.2. <u>Co-cultivo</u> .....	63
3.2.3. <u>Selección</u> .....	63
3.2.4. <u>Enraizamiento</u> .....	64
<b>4. Selección de líneas transformantes</b> .....	<b>65</b>
4.1. <i>Obtención de líneas transformantes homocigotas</i> .....	65
4.1.1. <u>Selección de líneas con una sola inserción</u> .....	65
4.1.2. <u>Selección de líneas homocigotas</u> .....	65
4.2. <i>Determinación de los niveles de expresión de ZePrx</i> .....	66
4.3. <i>Detección de ZePrx en muestras proteicas</i> .....	66
4.3.1. <u>Extracción de proteínas</u> .....	66
4.3.2. <u>Determinación del contenido en proteínas</u> .....	67
4.3.3. <u>Electroforesis disociante (SDS-PAGE)</u> .....	67
<i>Preparación de geles</i> .....	67

<i>Preparación de las muestras y desarrollo de la electroforesis</i> .....	68
<i>Tinción de los geles con nitrato de plata</i> .....	68
4.3.5. <u>Isoelectroenfoque (IEF)</u> .....	68
<i>Preparación de los geles</i> .....	68
<i>Desarrollo de la electroforesis</i> .....	68
<i>Tinción de los geles</i> .....	69
<b>5. Caracterización de la actividad peroxidasa</b> .....	69
5.1. <i>Determinación de la actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7)</i> .....	69
5.2. <i>Detección histoquímica de la actividad peroxidasa</i> .....	69
<b>6. Estudio biométrico</b> .....	70
<b>7. Caracterización de las paredes celulares</b> .....	71
7.1. <i>Extracción de paredes</i> .....	71
7.2. <i>Cuantificación de ligninas por el método del bromuro de acetilo</i> .....	71
7.3. <i>Caracterización de las ligninas mediante tioacidolisis</i> .....	71
7.4. <i>Detección histoquímica de las ligninas</i> .....	72
7.4.1. <u>Reacción de Wiesner</u> .....	73
7.4.2. <u>Reacción de Mäule</u> .....	73
7.5. <i>Análisis de la composición de los polisacáridos de pared</i> .....	73
7.5.1. <u>Cuantificación de celulosa</u> .....	73
7.5.2. <u>Contenido en ácidos urónicos</u> .....	73
7.5.3. <u>Contenido en azúcares neutros</u> .....	74
7.6. <i>Análisis mediante espectroscopía de infrarrojos (FT-IR)</i> .....	74
<b>8. Caracterización del comportamiento mecánico del tallo</b> .....	75
<b>9. Caracterización de los metabolitos y enzimas del ciclo ascorbato-glutación</b> .....	75
9.1. <i>Obtención de muestras</i> .....	75
9.2. <i>Determinación de la actividad peroxidasa (EC. 1.11.1.7)</i> .....	76
9.3. <i>Extracción del pool ascorbato-glutación</i> .....	76
9.4. <i>Cuantificación y determinación del estado redox del pool de ascorbato</i> .....	76
9.5. <i>Cuantificación y determinación del estado redox del pool de glutación</i> .....	77
9.6. <i>Extracción de enzimas implicadas en el ciclo ascorbato-glutación</i> .....	77
9.7. <i>Determinación de la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación</i> .....	77
9.7.1. <u>Ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11)</u> .....	78
9.7.2. <u>Dehidroascorbato reductasa (EC 1.8.5.1)</u> .....	78
9.7.3. <u>Monodehidroascorbato reductasa (EC 1.6.5.4)</u> .....	78
9.7.4. <u>Glutación reductasa (EC 1.8.17)</u> .....	78
9.7.5. <u>Catalasa (EC 1.11.1.6)</u> .....	78
<b>10. Estudio del transcriptoma</b> .....	79
10.1. <i>Obtención de muestras</i> .....	79

10.2. Extracción de RNA .....	79
10.3. RNA-Seq .....	79
10.3.1. <u>Generación de librerías</u> .....	79
10.3.2. <u>Secuenciación de nueva generación</u> .....	79
10.3.3. <u>Análisis de los datos de secuenciación</u> .....	80
10.4. PCR en tiempo real .....	80
<b>11. Análisis de datos</b> .....	<b>82</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>83</b>
<b>1. Obtención de plantas transformantes</b> .....	<b>85</b>
<b>2. Selección de líneas transformantes</b> .....	<b>86</b>
2.1. <i>Obtención de las líneas transformantes homocigotas</i> .....	86
2.2. <i>Determinación de los niveles de expresión de ZePrx</i> .....	86
2.3. <i>Detección de ZePrx en muestras proteicas</i> .....	88
2.3.1. <u>Electroforesis disociante (SDS-PAGE)</u> .....	88
2.3.2. <u>Isoelectroenfoque (IEF)</u> .....	91
<b>3. Caracterización de la actividad peroxidasa</b> .....	<b>93</b>
3.1. <i>Determinación de la actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7)</i> .....	93
3.2. <i>Detección histoquímica de la actividad peroxidasa</i> .....	100
<b>4. Estudio biométrico</b> .....	<b>102</b>
<b>5. Caracterización de las paredes celulares</b> .....	<b>104</b>
5.1. <i>Cuantificación de ligninas por el método del bromuro de acetilo</i> .....	104
5.2. <i>Caracterización de ligninas mediante tioacidolisis</i> .....	106
5.3. <i>Detección histoquímica de las ligninas</i> .....	111
5.4. <i>Análisis de la composición de polisacáridos de pared</i> .....	113
5.5. <i>Análisis mediante espectroscopía de infrarrojos (FT-IR)</i> .....	116
<b>6. Caracterización del comportamiento mecánico del tallo</b> .....	<b>123</b>
<b>7. Caracterización de los metabolitos y enzimas del ciclo ascorbato-glutatión</b> .....	<b>128</b>
7.1. <i>Expresión de ZePrx en hoja</i> .....	129
7.2. <i>Determinación de la actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7)</i> .....	130
7.3. <i>Cuantificación y determinación del estado redox del pool de ascorbato</i> .....	131
7.4. <i>Cuantificación y determinación del estado redox del pool de glutatión</i> .....	133
7.5. <i>Determinación de la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión</i> .....	135
<b>8. Estudio del transcriptoma</b> .....	<b>139</b>
8.1. RNA-Seq .....	139
8.1.1. <u>Genes diferencialmente expresados (GDE)</u> .....	141
8.1.2. <u>Expresión de las peroxidasas de clase III</u> .....	151
8.2. PCR en tiempo real .....	153
<b>V. CONCLUSIONS</b> .....	<b>157</b>

<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>161</b>
<b>A. Anexos.....</b>	<b>189</b>



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### I. INTRODUCCIÓN

#### Tablas

Tabla I.1. Peroxidasas de clase III implicadas en lignificación.....	40
--	----

#### Figuras

Figura I.1. Estructura de la pared vegetal .....	4
Figura I.2. Polímeros de la pared primaria.....	5
Figura I.3. Deposición de la pared secundaria en los elementos del xilema.....	8
Figura I.4. Subcapas de la pared secundaria.....	9
Figura I.5. Transición de la biosíntesis de pared primaria a secundaria .....	11
Figura I.6. Control transcripcional de la formación de la pared secundaria .....	12
Figura I.7. Monolignoles y unidades que originan al incorporarse en las ligninas.....	14
Figura I.8. Tejidos que lignifican .....	15
Figura I.9. Ruta fenilpropanoide y de biosíntesis de los monolignoles .....	18
Figura I.10. Oxidación de los alcoholes hidroxicinámlicos .....	22
Figura I.11. Formación de enlaces entre unidades G y S .....	23
Figura I.12. Clasificación de las peroxidasas.....	28
Figura I.13. Ciclo ascorbato-glutati6n.....	30
Figura I.14. Elementos de las peroxidasas de clase III .....	32
Figura I.15. Ciclos catal6ticos de las peroxidasas de clase III.....	35
Figura I.16. Funciones de las peroxidasas de clase III .....	37
Figura I.17. Siringil-peroxidasas .....	41

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### Tablas

Tabla III.1. Parejas de cebadores empleadas en la clonaci6n.....	58
Tabla III.2. Programas de PCR.....	60
Tabla III.3. Composici6n de los medios empleados en la transformaci6n de <i>N. tabacum</i> .....	63
Tabla III.4. Parejas de cebadores empleadas en la qPCR .....	81
Tabla III.5. Programa de PCR empleado en la qPCR.....	82

#### Figuras

Figura III.1. Mapa del plásmido pJIT62 .....	56
Figura III.2. Mapa de los plásmidos pGreen II 0179 y pSoup .....	59
Figura III.3. Esquema del T-DNA del plásmido pGreen II 0179( <i>ZePrx</i> ).....	61
Figura III.4. Etapas de la transformaci6n y regeneraci6n de <i>N. tabacum</i> .....	64
Figura III.5. Etapas del desarrollo floral de <i>N. tabacum</i> .....	70

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### *Tablas*

Tabla IV.1. Monómeros de las ligninas de los tallos de plantas de 6 semanas .....	107
Tabla IV.2. Monómeros de las ligninas de los tallos de plantas de 8 semanas .....	108
Tabla IV.3. Contenido en ascorbato .....	132
Tabla IV.4. Contenido en glutatión .....	134
Tabla IV.5. Actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión .....	135
Tabla IV.6. Estadísticas de la secuenciación de RNA .....	140
Tabla IV.7. Estadística del mapeo .....	140
Tabla IV.8. Genes reprimidos .....	146
Tabla IV.9. Genes inducidos .....	148
Tabla IV.10. Peroxidasas de clase III expresadas .....	152

##### *Figuras*

Figura IV.1. Amplificación por PCR del cDNA de <i>ZePrx</i> .....	85
Figura IV.2. Ensayos de resistencia a higromicina .....	86
Figura IV.3. Expresión de <i>ZePrx</i> .....	87
Figura IV.4. Patrón de proteínas del fluido apoplástico .....	89
Figura IV.5. Patrón de proteínas del fluido simplástico .....	90
Figura IV.6. Patrón de peroxidasas determinado mediante IEF .....	92
Figura IV.7. Actividad peroxidasa en el apoplasto del tallo de plantas de 6 semanas .....	94
Figura IV.8. Actividad peroxidasas en el simplasto del tallo de plantas de 6 semanas .....	95
Figura IV.9. Actividad peroxidasa en el apoplasto del tallo de plantas de 8 semanas .....	96
Figura IV.10. Actividad peroxidasa en el simplasto del tallo de plantas de 8 semanas .....	97
Figura IV.11. Ratio de actividad siringil-peroxidasa/guaiacil-peroxidasa .....	98
Figura IV.12. Detección histoquímica de la actividad peroxidasa total .....	100
Figura IV.13. Detección histoquímica de la actividad peroxidasa de tipo S .....	101
Figura IV.14. Longitud del tallo .....	103
Figura IV.15. Desarrollo floral .....	104
Figura IV.16. Ligninas totales .....	105
Figura IV.17. Composición monomérica de las ligninas de los tallos de 6 semanas .....	109
Figura IV.18. Composición monomérica de las ligninas de los tallos de 8 semanas .....	110
Figura IV.19. Ratio S/G de las ligninas .....	111
Figura IV.20. Detección histoquímica de ligninas mediante la tinción de Wiesner .....	112
Figura IV.21. Detección histoquímica de ligninas tipo S mediante la tinción de Mäule .....	113
Figura IV.22. Contenido en celulosa de las paredes .....	114
Figura IV.23. Contenido en monosacáridos y ácidos urónicos de las paredes .....	115
Figura IV.24. ACP de los espectros FT-IR de las paredes del tallo de plantas de 6 semanas ..	118



Figura IV.25. ACP de los espectros FT-IR de las paredes de los tallos de plantas de 8 semanas .....	119
Figura IV.26. Espectros diferenciales FT-IR. ....	121
Figura IV.27. Deformación elástica del tallo .....	125
Figura IV.28. Deformación máxima en fase elástica.....	126
Figura IV.29. Tensión máxima en fase elástica.....	127
Figura IV.30. Expresión de <i>ZePrx</i> .....	129
Figura IV.31. Actividad peroxidasa en hoja.....	130
Figura IV.32. Cuantificación de las distintas formas de ascorbato .....	132
Figura IV.33. Estado redox del <i>pool</i> ascorbato.....	133
Figura IV.34. Cuantificación de las distintas formas de glutatión .....	134
Figura IV.35. Actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión .....	136
Figura IV.36. Agrupamiento de los genes diferencialmente expresados (GDE) .....	143
Figura IV.37. Relación entre las proteínas que codifican los genes regulados en los tallos de 6 semanas.....	150
Figura IV.38. Expresión de GDEs en tallos de 6 semanas.....	154



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- 4CL: 4-cumarato CoA ligasa
- 4MN: 4-metoxi- $\alpha$ -naftol
- ABC: *ATP-binding cassette* (cassette de unión a ATP)
- ABTS: 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)
- AGPs: proteínas arabinogalactano
- APX: ascorbato peroxidasa
- ATR: *attenuated total reflectance* (reflectividad total atenuada)
- BAP: 6-benzilaminopurina
- BF<sub>3</sub> eterato: trifluoruro de boro dietil eterato
- BSTFA: *N,O* - bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
- C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa
- C4H: cinamato-4-hidroxilasa
- CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa
- CaMV: *cauliflower mosaic virus* (virus del mosaico de la coliflor)
- CAT: catalasa
- CCoAOMT: cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa
- CCR: cinamoil CoA reductasa
- CESA: celulosa sintasa
- COMT: ácido cafeico *O*-metiltransferasa
- conHO: coniferilaldehído
- conOH: alcohol coniferílico
- CSC: complejo celulosa sintasa
- CSE: cafeoil sikimato esterasa
- CSL: *cellulose synthase-like* (similar a celulosa sintasa)
- DHA: dehidroascorbato
- DHAR: dehidroascorbato reductasa
- dNTPs: desoxinucleótido trifosfato
- DTNB (5,5-ditiobis ácido 2-nitrobenzoico)
- DTT: DL-ditiotreitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

F5H: ferulato 5-hidroxilasa

*fc: fold-change* (cambio en el nivel de expresión)

FPKM: fragmentos por kilobase de transcrito por millón de lecturas

FT: factor transcripcional

FT-IR: *Fourier transformed infrared spectroscopy* (espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier)

GC-MS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

GDE: genes diferencialmente expresados

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

HCT: hidroxicinamoil CoA: sikimato/quinato hidroxicinamoiltransferasa

HG: homogalacturonano

*HygR*: gen de resistencia a higromicina B

IEF: isoelectroenfoque

iRNA: RNA de interferencia

LB: medio Luria-Bertani

MDHA: monodehidroascorbato

MDHAR: monodehidroascorbato reductasa

MS: Murashige & Skoog

NAA: ácido 1-naftalenacético

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido difosfato reducido

NEM: N-etilmaleimida

NGS: secuenciación de nueva generación

NPK: fertilizante a base de nitrógeno, fósforo y potasio

NST: *NAC secondary transcription* (NAC secundario transcripción)

OD<sub>600</sub>: densidad óptica a 600 nm

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PAL: fenilalanina amonio liasa

pI: punto isoeléctrico

- RG-I: ramnogalacturonano I
- RG-II: ramnogalacturonano II
- ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno)
- rt-PCR: *reverse transcription* PCR (PCR a partir de cDNA)
- SCM: sitio de clonaje múltiple
- SDS: sodio dodecil sulfato
- SE: sobreexpresión
- sinHO: sinapilaldehído
- sinOH: alcohol sinapílico
- SMRE: *secondary MYB recognition element* (sitio de reconocimiento de MYBs del desarrollo secundario)
- SNBE: *secondary NAC binding element* (elemento de unión de NACs de desarrollo secundario)
- SND: *secondary NAC domain* (dominio NAC secundario)
- SWN: *secondary wall NAC* (NAC de la pared secundaria)
- TAL: tirosina amonio liasa
- TCA: ácido tricloroacético
- TFA: ácido trifluoroacético
- TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina
- T-DNA: DNA de transferencia
- TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
- UDP: uridín difosfato
- UTR: *untranslated region* (región del mRNA que no se traduce)
- vv: vector vacío
- ZePrx: peroxidasa básica de *Z. elegans*



## ***I. INTRODUCCIÓN***

---





### 1. Pared celular vegetal

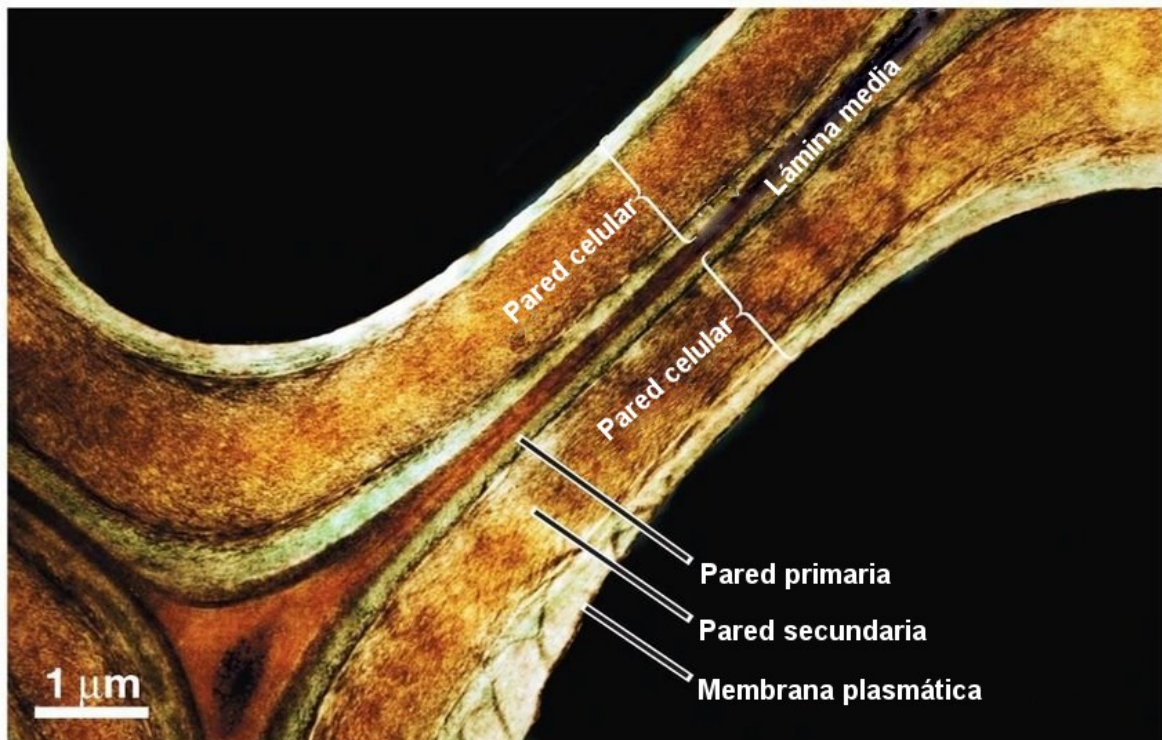
La pared celular vegetal es la matriz extracelular de todas las células vegetales que está compuesta por un entramado de celulosa y glucanos embebido en una matriz acuosa que contiene pectinas, proteínas e iones. El conjunto de paredes celulares y espacios intercelulares forman uno de los grandes compartimentos en el cuerpo de una planta, el apoplasto; mientras que los citoplasmas celulares junto con las membranas plasmáticas forman el simplasto (Albersheim *et al.* 2011).

Son funciones de la pared vegetal dar soporte y forma a la célula y a la planta, conferir resistencia a los tejidos frente a fuerzas de tensión, compresión y cizalla, regular la relación con el medio, proteger frente a patógenos, depredadores y daños mecánicos, etc. La pared celular nace con la célula y en sus primeras etapas va a permitir el crecimiento de la misma mostrando una cierta extensibilidad. Sin embargo, esta extensibilidad ha de equilibrarse con su capacidad de proporcionar sostén y protección (Albersheim *et al.* 2011). Su composición y estructura afectan a las propiedades mecánicas del tejido, influyendo en la función del mismo (Gibson 2012) y, por lo tanto, van a variar en función del tipo celular, modificándose durante los procesos de diferenciación. Además, la pared celular desempeña un papel clave en la relación de la célula con el medio, siendo clave en la defensa frente a patógenos y herbívoros y en la respuesta al estrés abiótico (Houston *et al.* 2016; Miedes *et al.* 2014; Tenhaken 2015).

#### 1.1. Estructura y composición de la pared vegetal

En la pared celular pueden diferenciarse varias capas con distinta composición. Desde el extremo más alejado al más cercano de la membrana plasmática encontramos la lámina media, la pared primaria y la pared secundaria. Cada una de estas capas presenta características y composición diferentes de acuerdo a su función en la pared (Fig. I.1). La lámina media es la capa que se encuentra entre dos paredes celulares. Deriva de la placa celular que se forma durante la citocinesis y es rica en pectinas. Su función principal es mantener unidas las dos células adyacentes. La pared primaria da forma y sostén a la célula, pero es una estructura permeable y flexible que permite que

las células se comuniquen entre ellas y crezcan. La pared secundaria se deposita internamente a la pared primaria y es más gruesa y rígida (Albersheim *et al.* 2011).



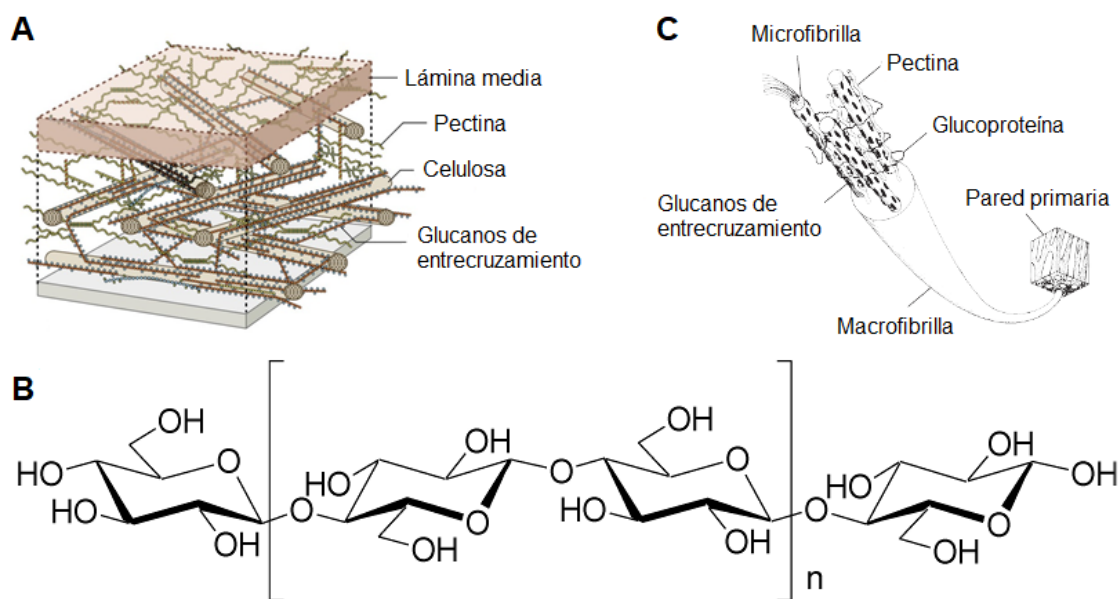
**Figura I.1. Capas de la pared vegetal.** Externamente se deposita la lámina media, la primera capa en formarse. A continuación, se deposita la pared primaria. Por último, en algunas células se forma una pared secundaria adyacente a la membrana plasmática, más gruesa y cristalina. Imagen tomada de Fardet 2017.

#### 1.1.1. Composición de la pared primaria

La pared primaria está presente en todas las células vegetales. Su contenido en agua es superior al 70% y, en ella, los distintos componentes se organizan en torno a dos redes polisacáridicas que le confieren forma y resistencia. La primera es la formada por las microfibrillas de celulosa y los glucanos de entrecruzamiento que las unen. Esta red confiere a la pared resistencia a las fuerzas de tensión y da forma y sostén a la célula (Albersheim *et al.* 2011). La segunda es la red de pectinas, que determina la permeabilidad de la pared, retiene agua y confiere resistencia a la compresión (Fig. I.2A) (Carpita *et al.* 2015).

*Celulosa*

La celulosa es el principal componente de la pared celular vegetal (25-30% de la pared primaria). Es un polisacárido paracristalino formado por repeticiones de celobiosa, un disacárido formado por glucosas unidas mediante enlaces *O*-glucosídicos  $\beta$ -1,4 (Fig. I.2B). Este tipo de enlaces dan como resultado un polisacárido prácticamente lineal. Las moléculas individuales de celulosa se asocian entre ellas mediante fuerzas de van der Waals, formando microfibrillas muy estables y resistentes a la tracción (Fig. I.2C) (McNamara *et al.* 2015).



**Figura I.2. Polímeros de la pared primaria. A. Ordenación de los diferentes polímeros en la pared primaria.** Celulosa, glucanos de entrecruzamiento y pectinas se disponen formando dos redes que dan sostén a la célula. **B. Celulosa.** Formada por repeticiones de celobiosa, un disacárido de glucosa unida por enlaces  $\beta$ -1,4. **C. Microfibrillas de celulosa.** Cada microfibrilla de celulosa está formada por varias cadenas paralelas de celulosa. Las diferentes microfibrillas se unen mediante interacciones débiles con los demás polímeros de la pared. Imágenes modificadas de Carpita *et al.* 2015, Siqueira *et al.* 2010 y Gibson 2012.

La biosíntesis de la celulosa está catalizada por enzimas celulosa sintasa (EC 2.4.1.12), que forman complejos en la membrana plasmática, sintetizando las fibras de celulosa directamente en la pared celular. Son glucosiltransferasas que utilizan como sustrato UDP-glucosa citosólica. En la formación de pared primaria en *Arabidopsis*

*thaliana* L. participan las isoformas *CesA1*, *CesA2*, *CesA3*, *CesA5*, *CesA6* y *CesA9* (McFarlane *et al.* 2014).

#### *Glucanos de entrecruzamiento*

Los glucanos de entrecruzamiento o hemicelulosas son polisacáridos capaces de formar puentes de hidrógeno con las microfibrillas de celulosa, formando una red con ella en la que contribuyen a la extensibilidad de la pared, contrarrestando la rigidez de la celulosa (Albersheim *et al.* 2011). Son un grupo complejo de polisacáridos y sus principales representantes en la pared varían en función del taxón vegetal. Gimnospermas, dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas presentan en su pared primaria xiloglucanos (Carpita *et al.* 2015). Estos consisten en un esqueleto central idéntico a la celulosa con sustituciones de xilosa, arabinosa, galactosa y fucosa (Albersheim *et al.* 2011). En cambio, las gramíneas presentan arabinoxilanos (Carpita *et al.* 2015). En este caso, el esqueleto central está formado por xilas unidas por enlaces *O*-glucosídicos  $\beta$  1-4 sustituidas con xilosa, arabinosa, ácido glucosilurónico y ácido 4-*O*-metil glucosilurónico (Albersheim *et al.* 2011).

Estos polisacáridos se sintetizan en el aparato de Golgi gracias a la actividad de enzimas de la familia CSL (*cellulose synthase-like*) (Albersheim *et al.* 2011) y una vez depositados en la pared celular son reordenados por xiloglucano endotransglucosilasas, generando cadenas de mayor tamaño (Fry 2003).

#### *Pectinas*

Las pectinas son polisacáridos con un contenido superior al 20% en ácido D-galacturónico. Los principales polisacáridos de este grupo presentes en la pared primaria son el homogalacturonano (HG) y los ramnogalacturonanos I y II. Se diferencian en función de la composición de su esqueleto principal y las cadenas laterales, presentando arabinosa, galactosa, fucosa y ácido glucosilurónico entre otros monosacáridos (Albersheim *et al.* 2011). El ramnogalacturonano II (RG-II) es el más complejo de los tres con sustituciones de hasta 11 monosacáridos diferentes (Carpita *et al.* 2015).

Al igual que las glucanos de entrecruzamiento, los polisacáridos pécticos se sintetizan en el aparato de Golgi, interviniendo un gran número de enzimas que determinan el tipo de polisacáridos formados (Fry 2003).

### *Proteínas*

Entre el 1 y el 10% del peso seco de la pared primaria está formada por proteínas, glucoproteínas o proteoglicanos. Estas pueden ser solubles, estar unidas débilmente a la pared o mediante enlaces covalentes (Jamet *et al.* 2006).

De acuerdo con sus funciones estas proteínas pueden dividirse entre estructurales y no estructurales. Las proteínas estructurales contribuyen a las propiedades físicas de la pared formando una tercera red estructural (Carpita *et al.* 2015). Por otro lado, las proteínas no-estructurales pueden moverse por la matriz acuosa de la pared y desempeñan funciones más diversas. Son importantes en este grupo las AGPs, proteoglicanos implicados en anclar la pared a la membrana plasmática (McFarlane *et al.* 2014). También destaca la gran variedad de proteínas con actividad enzimática implicadas en el metabolismo de la misma, principalmente en hidrolasas, transferasas, liasas y oxidorreductasas (Fry 2003).

### 1.1.2. Composición de la pared secundaria

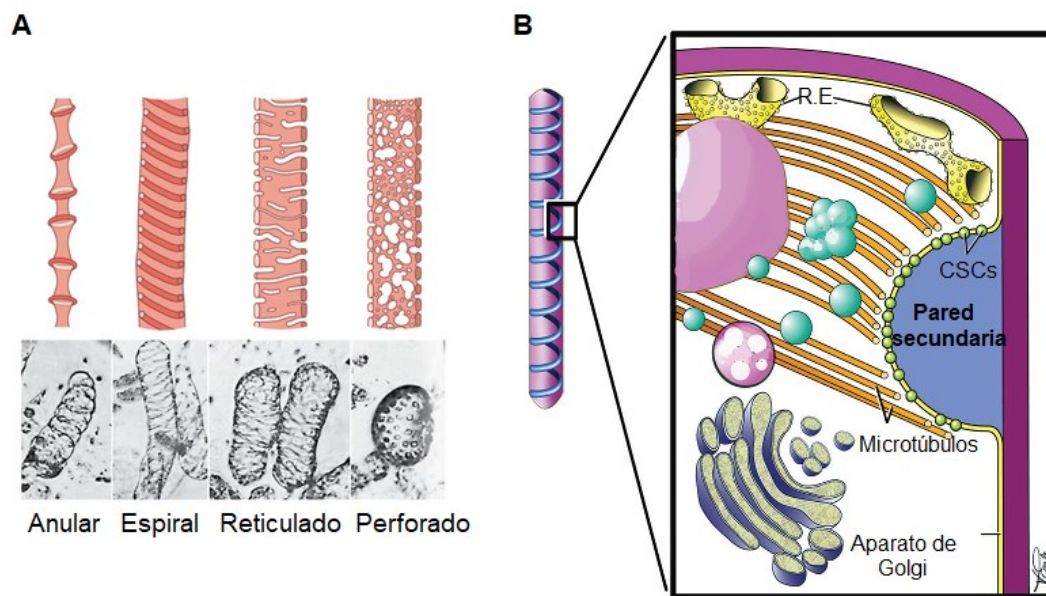
Una vez que cesa el crecimiento celular, algunas células adquieren una pared secundaria. Es el caso de los elementos de transporte del xilema y el floema y las fibras del esclerénquima. Esta pared secundaria es más gruesa que la primaria y presenta más celulosa y menos pectinas (Zhong & Ye 2015).

El depósito de pared secundaria puede seguir un patrón específico en torno a la célula, en lugar de realizarse de forma homogénea (Fig. I.3). De esta manera, se refuerzan las paredes celulares, pero se mantiene la comunicación entre células. Este patrón está controlado por los microtúbulos corticales que dirigen el depósito de vesículas del aparato de Golgi a zonas específicas de la pared (Zhong & Ye 2015).

### *Celulosa*

Las microfibrillas de celulosa se disponen en haces paralelos de una forma mucho más organizada que en la pared primaria, formando una estructura altamente

organizada y cristalina. En *A. thaliana* las isoformas de celulosa sintasa implicadas en la formación de la pared secundaria son *CesA4*, *CesA7* y *CesA8* (McFarlane *et al.* 2014). Durante la formación de la pared secundaria las unidades de celulosa sintasa se organizan en complejos (CSCs), denominados rosetas, de entre entre 18 y 24 CESAs (Meents *et al.* 2018). Cada celulosa sintasa de la roseta puede formar una fibra de celulosa, que se asocia con las generadas por los demás para formar una microfibrilla de celulosa (Kumar & Turner 2015). La dirección en la que se depositan las microfibrillas en la pared está determinada por los microtúbulos localizados en el córtex del citoplasma sobre los que se desplazan los CSCs (Fig. I.3B) (Li *et al.* 2015).

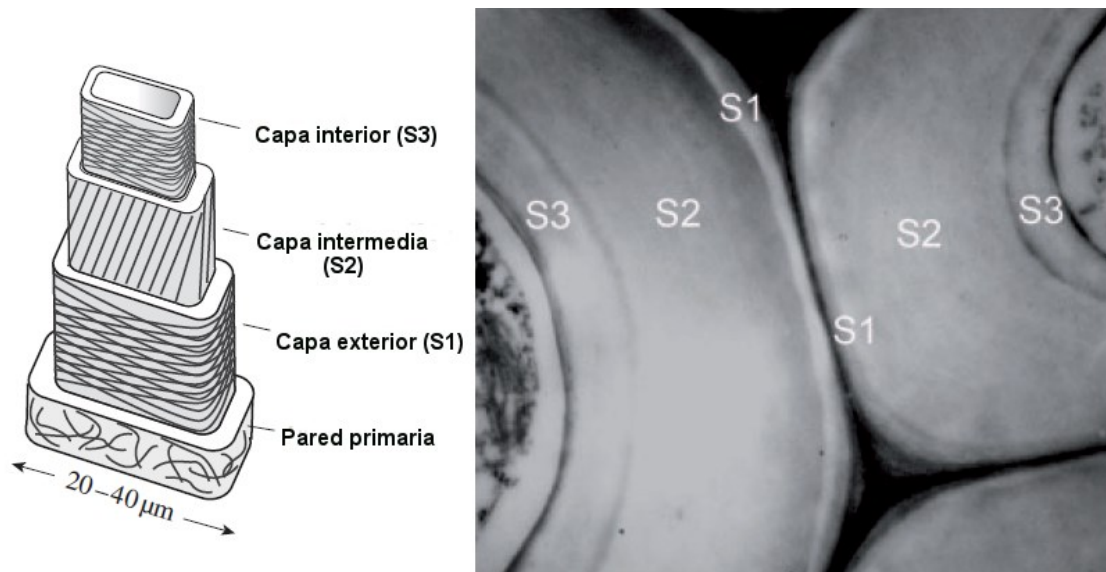


**Figura I.3. Deposición de la pared secundaria en los elementos del xilema. A. Diferentes patrones de deposición en la pared secundaria.** Estos patrones se deben a la deposición selectiva de pared secundaria en puntos específicos de la pared mediada por los complejos celulosa sintasa (CSCs).

**B. Deposición de la pared secundaria de acuerdo a un patrón.** Los microtúbulos determinan la orientación y el lugar de la biosíntesis de la celulosa. R.E.: retículo endoplasmático. Figuras modificadas de Carpita *et al.* 2015 y Meents *et al.* 2018.

La pared secundaria se organiza en tres subcapas, S1, S2 y S3, de más externa a más interna (Fig. I.4), que se diferencian en la orientación de los haces de celulosa y en el grosor de las mismas. La S2, la más gruesa de las tres, presenta microfibras de celulosa orientadas casi paralelamente al eje vertical de la célula (Zhong & Ye 2015).

La alternancia en las orientaciones de la celulosa consigue maximizar la resistencia del tejido a fuerzas de tensión en distintas direcciones.



**Figura I.4. Subcapas de la pared secundaria**, de más externa a más interna: S1, S2 y S3. La S2 tiene las fibras de celulosa orientadas paralelamente al eje principal de la célula. Figuras tomadas de Gibson 2012 y Zhong & Ye 2015.

### *Glucanos de entrecruzamiento*

Los xilanos son los glucanos de entrecruzamiento propios de las paredes secundarias. Son sintetizados por glucosiltransferasas de varias familias y su estructura consiste en un esqueleto de xilosas unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4, que pueden estar *O*-acetiladas o unidas a otros monosacáridos. Estas sustituciones modifican las propiedades del xilano (Ebringerová & Heinze 2000).

En función de estas sustituciones se diferencian distintos tipos de xilanos. En dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas la forma más habitual es el glucuronoxilano, mientras que en gimnospermas y en gramíneas abunda más el glucuronoarabinoxilano. Además, en las especies leñosas es relevante la presencia de glucomananos en dicotiledóneas y galactomananos en gimnospermas (Zhong & Ye 2015).

### *Ligninas*

En algunos tejidos la pared secundaria está impregnada de ligninas. Estas son polímeros fenólicos amorfos e hidrofóbicos que son sintetizados por polimerización

oxidativa de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (Vanholme *et al.* 2010). Las ligninas desplazan la fase acuosa de la pared, impermeabilizándola, aumentan su rigidez y resistencia a la compresión y protegen a las microfibrillas celulosa frente a la degradación (Grabber 2005).

Las ligninas empiezan a depositarse en las esquinas de la pared celular, se extienden por la lámina media y, finalmente, se depositan en la pared secundaria (Tobimatsu *et al.* 2013). El contenido en ligninas varía entre las tres subcapas de la pared secundaria, siendo mayor en la S1, que en las capas más internas (Gibson 2012). Esta localización alejada del lumen celular contribuye a prevenir la cavitación en las células del xilema (Sperry 2003).

La lignificación ocurre en algunos tipos celulares durante el desarrollo normal de la planta (elementos del xilema, células del esclerénquima, células de la endodermis, etc.), pero también ocurre de forma ectópica como respuesta al estrés biótico o abiótico (Barros *et al.* 2015).

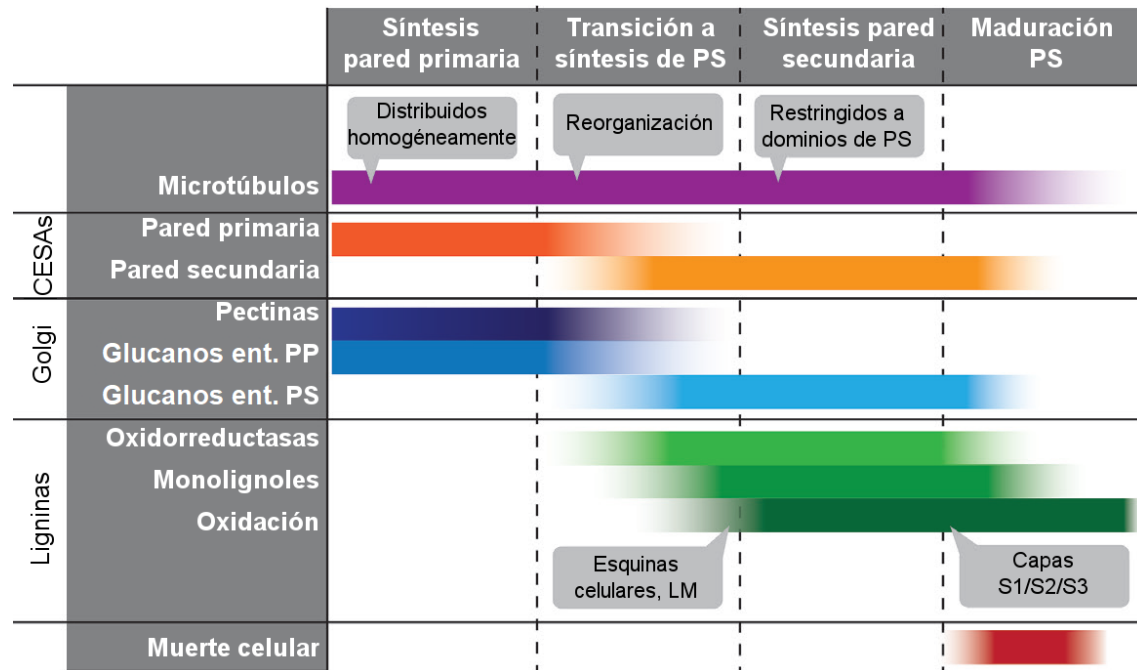
### 1.2. Control de la formación de la pared secundaria

La formación de pared secundaria es un proceso costoso para la planta, especialmente si esta está impregnada de ligninas, ya que éstas suponen un sumidero permanente de carbono fijado mediante fotosíntesis y su biosíntesis conlleva un alto consumo de energía (Amthor 2003). Por ello, ha de estar sujeta a un estricto control que permita un empleo eficaz de los recursos de los que dispone la planta (Barros *et al.* 2015).

En las plantas vasculares, el tejido con una mayor proporción de células con pared secundaria es el xilema, alcanzando su máxima expresión durante el crecimiento secundario de tallo y raíces. Durante este proceso, ha de coordinarse la biosíntesis de todos los componentes de la pared secundaria y la muerte celular de los elementos conductores. Dada la complejidad de estudiar este proceso *in planta* se han ido desarrollado modelos *in vitro* en los que estudiar la diferenciación de tipos celulares que presentan pared secundaria. Es el caso de las suspensiones de elementos traqueales de *Zinnia elegans* Jacq. (Fukuda & Komamine 1980), *Pinus taeda* L. (Eberhardt *et al.* 1993) o *A. thaliana* (Kubo *et al.* 2005). Estos sistemas modelo han permitido definir etapas e identificar proteínas y genes implicados en la biosíntesis de



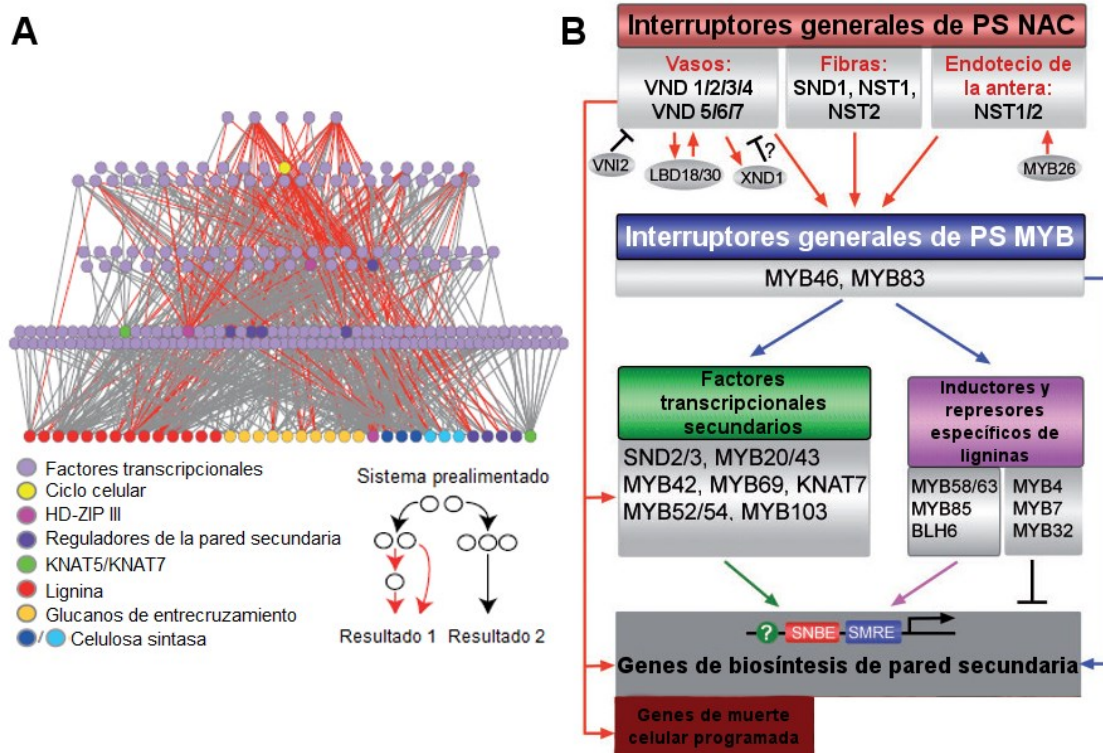
la pared, inhibiéndose aquellos implicados en la síntesis y mantenimiento de la pared primaria y activándose los responsables de la formación de la pared secundaria (Fig. I.5) (Meents *et al.* 2018).



**Figura I.5. Transición de la biosíntesis de pared primaria a secundaria.** Cambios en la expresión génica derivados de la biosíntesis de la pared secundaria. Estos conllevan una reorganización de los microtúbulos, el cambio de las isoenzimas celulosa sintasa (CESA) que se expresan, la restricción de biosíntesis de pectinas y el cambio de glucanos de entrecruzamiento (Glucanos ent.) de pared primaria por de los pared secundaria como el xilano. Además, se sintetizan ligninas y en algunos tipos celulares tiene lugar la muerte programa de la célula, como es el caso de los elementos traqueales. PP: pared primaria. PS: pared secundaria. LM: lámina media. Figura modificada de Meents *et al.* 2018.

### 1.2.1. Control transcripcional de la formación de la pared secundaria

La regulación transcripcional de los genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria consiste en un sistema jerárquico controlado principalmente por factores transcripcionales (FTs) de tipo NAC y MYB. Este sistema presenta varias capas y al final del mismo se encuentran los genes implicados en la biosíntesis de ligninas, celulosa y xilano (Fig. I.6A). El hecho de que estos genes se regulen de forma común favorece la coordinación entre ellos para generar la pared secundaria y prueba de su eficacia es su conservación a lo largo de la evolución de las plantas vasculares (Zhao 2016).



**Figura I.6. Control transcripcional de la formación de la pared secundaria. A. Sistema multinivel para el control de los genes implicados en la formación la pared secundaria.** El sistema de control transcripcional de la pared secundaria es un sistema complejo que implica un gran número de elementos ordenados de forma jerárquica. **B. Principales factores transcripcionales implicados en el control de la biosíntesis de la pared secundaria.** Esta cascada de señales se inicia en diferentes tejidos gracias a diferentes factores transcripcionales de tipo NAC, capaces de activar a otros factores transcripcionales y a los genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria y la muerte celular.

Figuras modificadas de Taylor-Teeple *et al.* 2015 y Zhong & Ye 2015.

El nivel superior de control está a cargo de FTs de tipo NAC (SWNs: *Secondary Wall NACs*). Estos actúan como interruptores generales de la biosíntesis de pared secundaria en tejidos concretos: VND6 y VND7 en las células del xilema (Kubo *et al.* 2005), SND1 y NST1 en las fibras vasculares e interfasciculares (Zhong *et al.* 2007) y NST1 y NST2 en las anteras (Mitsuda *et al.* 2005). Este papel de los SWNs como iniciadores de esta cascada de regulación está presente ya en las primeras plantas vasculares (Xu *et al.* 2014). En el xilema existe un nivel adicional de control por encima de VND6 y VND7 a cargo de E2Fc, que puede activar o reprimir la formación de pared secundaria en función de su concentración (Taylor-Teeple *et al.* 2015) (Fig. I.6).

Estos factores NAC, diferentes en función del tejido, actúan sobre una red común de FTs (Zhong *et al.* 2008). En *A. thaliana* se han identificado como elementos clave de esta red factores de tipo MYB. MYB46 y MYB83 actúan de forma redundante como interruptores generales de la cascada responsable de la formación de la pared secundaria (Fig. I.6B) (Zhong & Ye 2014).

Los interruptores generales de tipo NAC y MYB modulan la expresión de factores transcripcionales de diferentes familias (MYB, NAC, AP2-EREBP, bZip, ZF-HD) y de genes efectores (Zhong & Ye 2014). Los primeros, a su vez, pueden controlar a otros FTs o actuar directamente sobre la formación de la pared secundaria. Aunque existe un sistema jerárquico, los FTs funcionan como un sistema prealimentado (Fig. I.6A) y entre ellos se establecen bucles de retroalimentación y redundancias que garantizan la estabilidad del sistema de expresión y su control (Taylor-Teeples *et al.* 2015; Zhong & Ye 2014).

El patrón de expresión de los genes implicados en la formación de la pared secundaria y su coordinación es posible gracias a la presencia de elementos comunes en sus promotores que hacen que respondan a los mismos estímulos (Fig. I.6B) (Zhong & Ye 2014). Es el caso de los elementos AC, a los que se unen FTs de tipo MYB y están presentes en los promotores de todos los genes de la ruta de biosíntesis de las ligninas a excepción de los implicados en la biosíntesis del alcohol sinapílico, que están regulados de una forma ligeramente distinta al resto de la ruta (Raes *et al.* 2003; Zhong & Ye 2009).

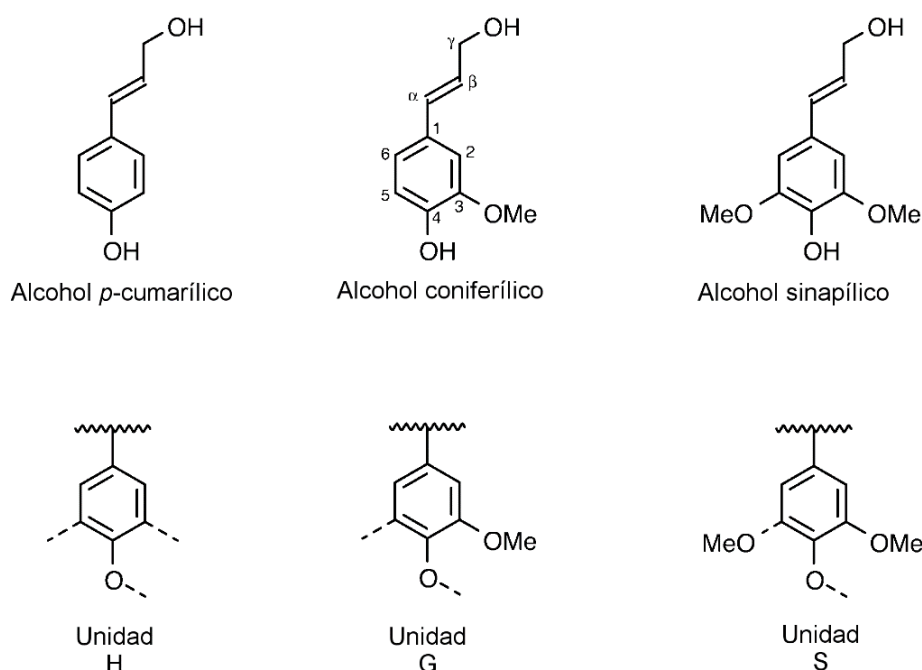
En el caso de la ruta de biosíntesis de las ligninas se observa, además, una importante coordinación interna, ya que el nivel de expresión de las distintas enzimas se mantiene equilibrado mediante bucles de retroalimentación. Algunos de estos sistemas de coordinación consisten en que algunos productos de la propia ruta actúan como inhibidores de la transcripción de algunos genes que codifican las enzimas de la ruta. Otros actúan directamente como inhibidores bioquímicos de la actividad de algunas enzimas (Boerjan *et al.* 2003).

En coherencia con la necesidad de regular la formación de pared secundaria y la lignificación de acuerdo al programa de desarrollo de la planta, los niveles de algunos de los FTs mencionados se modifican como respuesta a los niveles de distintas fitohormonas (Kubo *et al.* 2005). También se ha observado que algunos de los

elementos de la cascada de regulación son sensibles a estímulos de estrés abiótico y, por lo tanto capaces de integrarlos en la regulación de esta ruta (Taylor-Teeples *et al.* 2015).

## 2. Lignificación

La lignificación consiste en el depósito de ligninas en la pared celular, intercalándose entre los espacios existentes entre el resto de componentes de la pared. Como resultado de este proceso la pared celular se impermeabiliza, se hace más rígida y más resistente a la degradación (Vanholme *et al.* 2010).



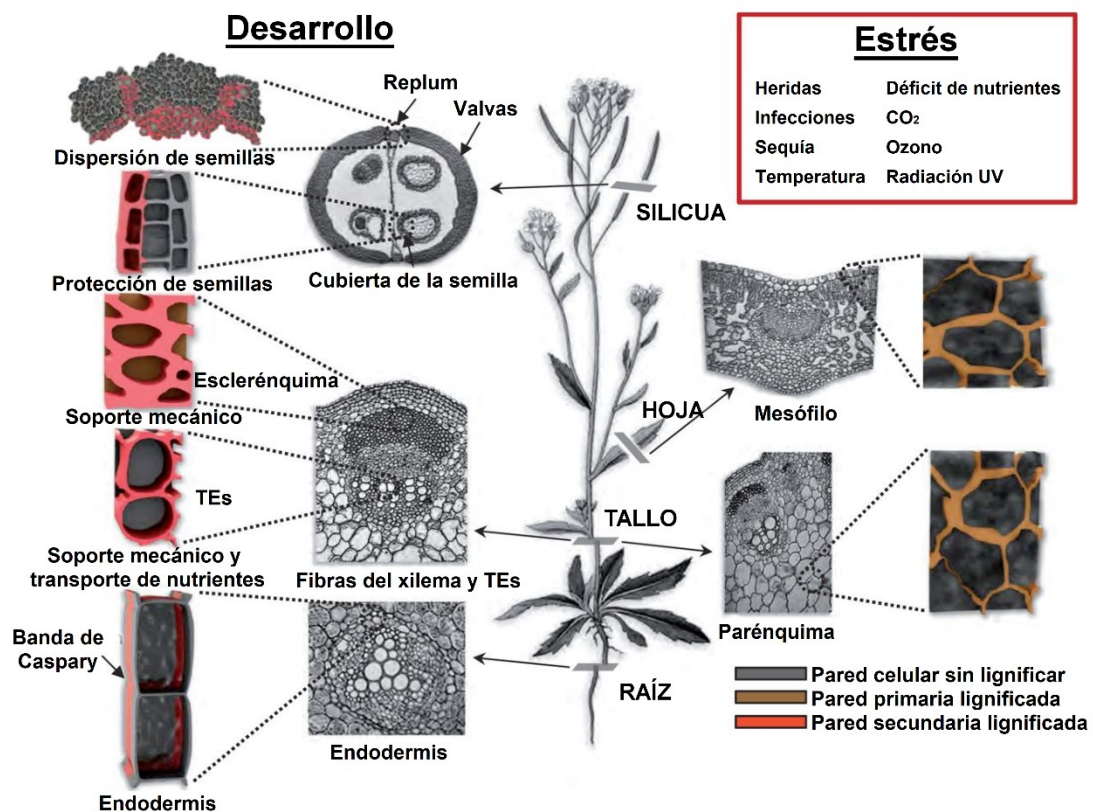
**Figura I.7. Monolignoles y unidades que originan al incorporarse en las ligninas.** Las ligninas están formadas, principalmente, por tres alcoholes hidroxicinamílicos (*p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico) que dan lugar a tres unidades (H: hidroxifenilo, G: guaiacilo y S: siringilo). Figura modificada de Ralph *et al.* 2004.

Las ligninas son polímeros fenólicos amorfos e hidrofóbicos que se sintetizan por polimerización oxidativa de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos: *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico; que son precursores de las unidades *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S), respectivamente (Fig. I.7) (Vanholme *et al.* 2010). Debido

a su presencia en todas las plantas vasculares constituyen el segundo polímero biológico terrestre más abundante tras la celulosa (Boerjan *et al.* 2003).

2.1. *Funciones de las ligninas*

La colonización de los ambientes terrestres supuso la aparición de grandes retos para los vegetales: regulación del intercambio de agua con el ambiente, transporte de agua dentro del organismo, protección frente a la radiación UV-B, soporte mecánico en el medio aéreo y protección frente a patógenos y herbívoros. Las ligninas permiten responder a estos problemas de forma eficaz, por lo que jugaron un papel clave en la colonización del medio terrestre durante la transición del Ordovícico al Silúrico hace alrededor de 450 millones de años (Delaux *et al.* 2012).



**Figura I.8. Tejidos que lignifican.** La deposición de ligninas se da en la planta en distintos tejidos durante el desarrollo vegetal o como respuesta a estrés. TEs: elementos traqueales. Figura modificada de Barros *et al.* 2015.

Estos polímeros desempeñan un papel en el desarrollo normal de las plantas, ya que se depositan de forma programada en diferentes tejidos (Fig. 1.8) (Barros *et al.* 2015). En el xilema, responsable del transporte de agua desde la raíz a las partes aéreas de la planta, las ligninas impermeabilizan las paredes, ofreciendo una vía de baja resistencia para el transporte de agua, a la vez que las refuerzan para soportar las presiones negativas generadas por la transpiración (Pereira *et al.* 2018; Sperry 2003; Voelker *et al.* 2011). Además, las ligninas complementan las propiedades mecánicas de la celulosa, confiriendo a la pared resistencia a los esfuerzos de compresión y contribuyendo, así, al sostén de la misma en el medio aéreo (Volkman & Baluška 2006). Estas dos características, transporte de agua más eficiente y sostén mecánico, han hecho posible la aparición de especies vegetales de mayor tamaño (Sperry 2003).

Por otro lado, las ligninas también son imprescindibles en la protección frente a múltiples patógenos (Miedes *et al.* 2014) y como respuesta a distintos tipos de estrés abiótico: la deshidratación, la exposición a luz ultravioleta, las lesiones de tipo mecánico, la exposición a metales pesados, etc. (Moura *et al.* 2010).

## 2.2. Biosíntesis de las ligninas

La biosíntesis de las ligninas se inicia en el interior celular con la síntesis de los monolignoles. Estos son transportados a través de la membrana plasmática, donde son oxidados enzimáticamente para iniciar la polimerización de los mismos para dar lugar a las ligninas (Barros *et al.* 2015; Boerjan *et al.* 2003; Bonawitz & Chapple 2010; Ralph *et al.* 2004; Vanholme *et al.* 2010).

### 2.2.1. Biosíntesis de monolignoles

Las ligninas se generan gracias a una serie de reacciones que se ordenan en cuatro pasos fundamentales: el metabolismo del ácido shikímico, la ruta fenilpropanoide, la ruta específica de los monolignoles y la polimerización oxidativa de los mismos. La mayoría de los genes que codifican las enzimas implicadas en la producción de monolignoles ya están presentes en plantas basales que no sintetizan ligninas pero sí son capaces de producir monolignoles, como el musgo *Physcomitrella patens* (Hedw.) Buch & Schimp. (Xu *et al.* 2009).

### *Metabolismo del ácido sikímico*

Esta ruta tiene como precursores el fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato y en ella se genera corismato, que constituye la base del esqueleto hidrocarbonado de los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano. Fenilalanina y tirosina sirven como precursores de una gran variedad de compuestos en las plantas: monolignoles, isoflavonoides, flavonoides, taninos, antocianinas y derivados de la espermidina y la cumarina (Tohge *et al.* 2013 y Tzin & Galili 2010). Las enzimas que participan en esta ruta se localizan en los cloroplastos y sus productos son transportados al citosol para participar en otras rutas metabólicas (Maeda & Dudareva 2012).

### *Ruta fenilpropanoide*

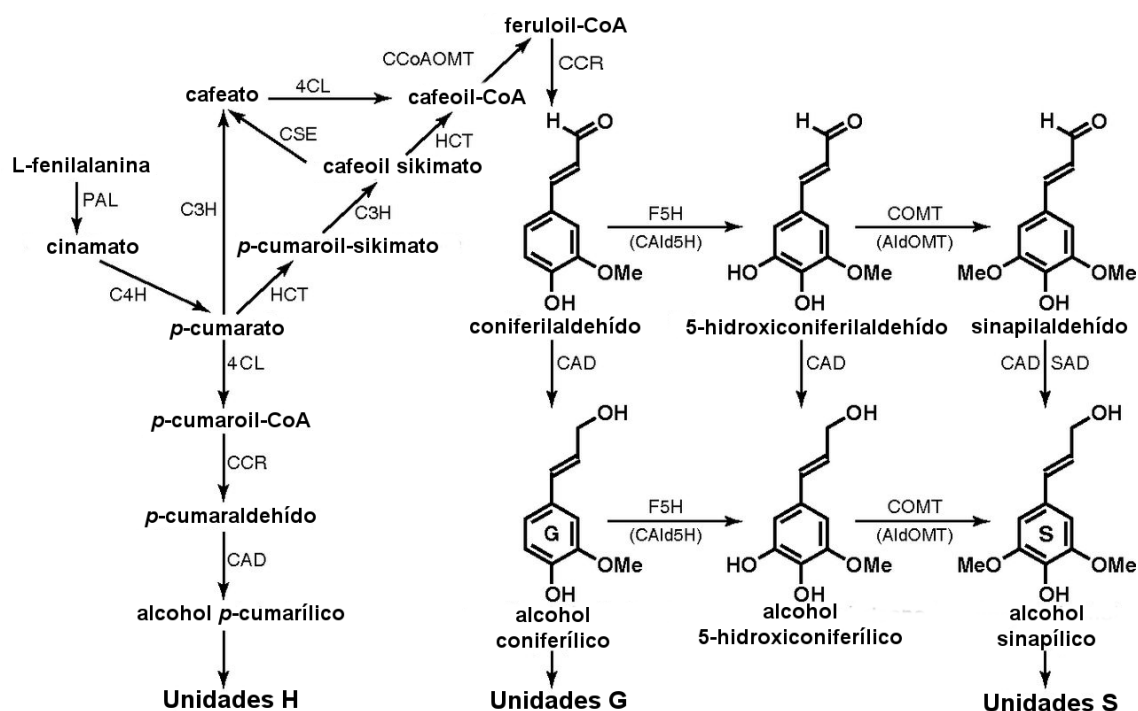
Esta ruta se inicia con el aminoácido L-fenilalanina y culmina con la formación de ácido *p*-cumárico, que sirve de precursor de múltiples compuestos fenólicos de la planta (ligninas, suberina, chalconas, lignanos, flavonoides y antocianinas) (Bonawitz & Chapple 2010 y Ferrer *et al.* 2008). La fenilalanina es desaminada por la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.25) para generar ácido *trans*-cinámico. A continuación, este es hidroxilado por la cinamato-4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.13.11) dando lugar a ácido *p*-cumárico (Fig. I.9). En monocotiledóneas, la PAL posee también actividad tirosina amonio liasa (TAL, EC 4.3.1.25), por lo que es capaz de desaminar también el aminoácido tirosina, siendo este otro precursor disponible para la síntesis de ácido *p*-cumárico (Barros *et al.* 2015).

### *Ruta específica de los monolignoles*

El último tramo de la biosíntesis de los monolignoles está catalizado por una serie de enzimas que se localizan en el citosol o en la cara citosólica del retículo endoplasmático (Barros *et al.* 2015). La mayoría de las reacciones de esta ruta están destinadas a reducir los compuestos intermedios desde ácidos a alcoholes y a hidroximetilar el anillo fenólico. Se generan, así, los tres monolignoles, que se diferencian, precisamente, en el grado de hidroximetilación de sus carbonos 3 y 5 (Fig. I.7).

## Caracterización funcional de la última etapa de la biosíntesis de ligninas mediante la sobreexpresión de peroxidadas en plantas modelo

En esta ruta el ácido *p*-cumárico puede seguir varios destinos hasta dar lugar a los tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (Fig. I.9). Para repartir el flujo de carbono entre estos tres productos juegan un papel especialmente importante dos enzimas que catalizan las reacciones responsables de las ramificaciones: la 4-cumarato CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12), que inicia la ruta que da origen al alcohol *p*-cumárico, y la ferulato 5-hidroxilasa (F5H, EC 1.14.13.-), que cataliza la hidroxilación del carbono 5 del esqueleto, iniciando la biosíntesis del alcohol sinapílico (Boerjan *et al.* 2003; Vanholme *et al.* 2010) (Fig. I.9).



**Figura I.9. Ruta fenilpropanoide y de biosíntesis de los monolignoles.** Esta ruta empieza con la desaminación de la fenilalanina y culmina con la formación de los tres alcoholes hidroxicinamílicos.

PAL: fenilalanina amonio-liasa (EC 4.3.1.25), C4H: cinamato-4-hidroxilasa (EC 1.14.13.11), 4CL: 4-cumarato CoA ligasa (EC 6.2.1.12), CCR: cinamoil CoA reductasa (EC 1.2.1.44), CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.195), HCT: hidroxicinamoil CoA: sikimato/quinato hidroxicinamoiltransferasa (EC 2.3.1.133), C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa (EC 1.1.14.13.-), CSE: cafeoil sikimato esterasa (EC 3.1.1.-), CCoAOMT: cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa (EC 2.1.1.104), F5H: ferulato-5-hidroxilasa (EC 1.14.13.-), COMT: cafeato *O*-metiltransferasa (EC 2.1.1.68), SAD: sinapil alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.195). Figura modificada de Wagner *et al.* 2015.



El estudio de diferentes mutantes para alguna de las enzimas implicadas en la ruta ha permitido observar que no hay una única vía para la biosíntesis de cada uno de los monolignoles (Anterola & Lewis 2002; Boerjan *et al.* 2003). Por ejemplo, existen hasta 3 rutas diferentes para la biosíntesis del feruloil-CoA (Vanholme *et al.* 2013). Por otro lado, muchas de las enzimas que participan en esta ruta son capaces de utilizar más de un compuesto como sustrato. Es el caso de la F5H, que transforma preferentemente el coniferilaldehído, aunque también puede emplear como sustratos el alcohol coniferílico y el ferulato (Humphreys *et al.* 1999) (Fig. I.9). Por ello, se puede decir que estamos ante una red metabólica en lugar de una ruta. Ya que hay cierta flexibilidad en la sucesión de reacciones en la biosíntesis de cada uno de los monolignoles finales.

### 2.2.2. Transporte de monolignoles a la pared

Los monolignoles sintetizados en el citosol necesitan ser transportados a la pared donde se produce la polimerización de las ligninas. Las opciones preferidas para explicar el transporte de monolignoles son la difusión pasiva y la participación de transportadores de tipo ABC (*ATP-binding cassette*). Aunque se ha observado que la membrana plasmática permite la difusión pasiva de los monolignoles (Boija & Johansson 2006), el trabajo con vesículas derivadas de la membrana de *A. thaliana* ha permitido comprobar que se produce un transporte específico dependiente de transportadores de tipo ABC (Miao & Liu 2010). También en *A. thaliana* se ha identificado el transportador *AtABCG29* como el responsable de exportar alcohol *p*-cumarílico al apoplasto (Alejandro *et al.* 2012).

Una vez en la pared celular, los monolignoles pueden migrar por el apoplasto y llegar hasta las paredes de células vecinas (Tobimatsu *et al.* 2013). De hecho, algunas células que no depositan ligninas en sus paredes sintetizan monolignoles para contribuir a las paredes de las células adyacentes. En *A. thaliana* las fibras interfasciculares sintetizan los precursores de las ligninas que se depositarán en su pared. En cambio, los elementos de los vasos del xilema son lignificados de forma normal aun cuando son incapaces de producir alcoholes *p*-hidroxicinámicos (Smith *et al.* 2013). En este segundo caso, las células parenquimáticas del xilema son las responsables de proporcionar gran parte de los monolignoles (Smith *et al.* 2017).

### 2.2.3. Enzimas implicadas en la oxidación de monolignoles

Los monolignoles son oxidados enzimáticamente en el apoplasto para poder ser incorporados a las ligninas. Aunque poco a poco se van identificando isoenzimas responsables de la lignificación en distintas especies, establecer la relación entre una isoenzima concreta y su función es una tarea compleja. Para poder afirmar que existe tal relación han de cumplirse los siguientes supuestos (Ros Barceló 1997):

- que la enzima muestre especificidad de sustrato por los monolignoles,
- que esté presente en la pared celular,
- que se conozca su estructura primaria,
- que tenga una correlación temporal con la lignificación activa,
- que presente una amplia distribución en las especies de plantas vasculares y
- que sea capaz de oxidar los alcoholes cinamílicos a compuestos similares a las ligninas.

A día de hoy, dos tipos de enzimas se consideran como responsables de este proceso: peroxidasas de clase III (EC 1.11.1.7) (Fernández-Pérez *et al.* 2014, 2015; Gabaldón *et al.* 2005; Herrero *et al.* 2013; Lee *et al.* 2013; Shigeto *et al.* 2015) y lacasas (EC 1.10.3.2) (Berthet *et al.* 2011; Wang *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2013). Las primeras emplean H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar los monolignoles, mientras que las segundas usan como co-sustrato el oxígeno.

Las peroxidasas de clase III surgieron con la aparición de las plantas terrestres y sufrieron múltiples eventos de duplicación en las primeras etapas de la evolución de las mismas, aumentando el número de copias presente en los genomas vegetales. Este proceso ocurrió en paralelo a la aparición de la lignificación, por lo que se infiere una relación entre estos dos eventos; mientras que la relación entre la presencia de lacasas en el genoma de un organismo y su capacidad para sintetizar ligninas no es tan clara (Delaux *et al.* 2012). Se ha propuesto que las lacasas fuesen las responsables de la polimerización de las ligninas cuando surgió su ruta de biosíntesis y que, posteriormente, las peroxidasas de clase III pasaron a ser las principales responsables de la polimerización (Weng & Chapple 2010). Esta idea se ve apoyada porque las lacasas están presentes en antecesores de las plantas terrestres y tienen muy poca representación en monocotiledóneas (Ros Barceló 1997). Actualmente, algunos

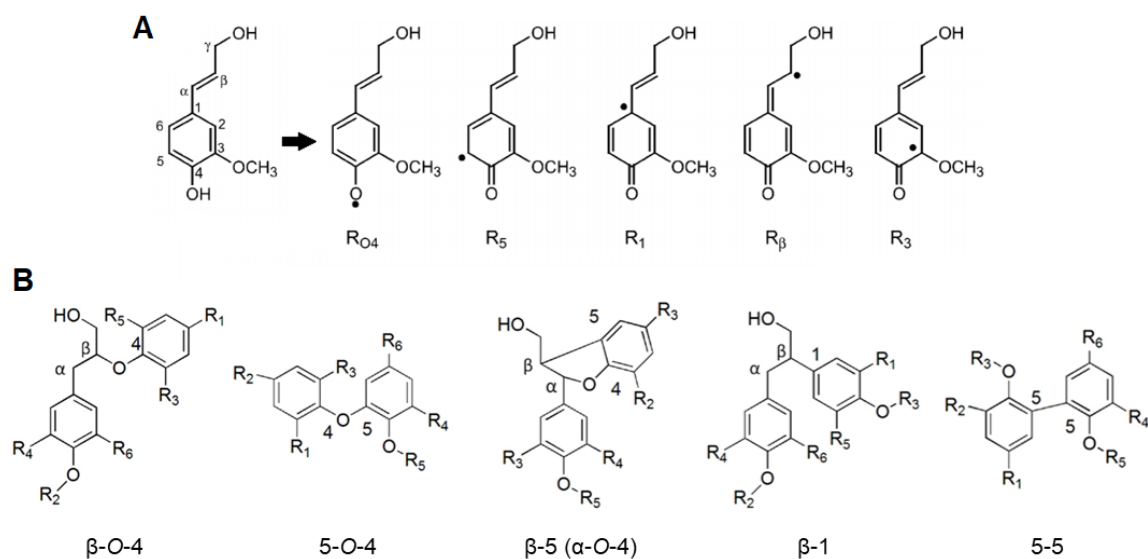
estudios apuntan a que las funciones de estas dos enzimas pueden complementarse (Zhao *et al.* 2013).

### 2.2.4. Polimerización oxidativa

La polimerización de las ligninas, en contraposición a lo que ocurre en la biosíntesis de proteínas o ácidos nucleicos, no responde a un patrón predeterminado que dé lugar a una estructura ordenada. Durante este proceso, las enzimas implicadas oxidan los monolignoles generando radicales libres que reaccionan químicamente entre ellos, formando un polímero.

Los monolignoles oxidados son relativamente estables gracias a que el electrón desapareado originado en su oxidación se encuentra deslocalizado entre los múltiples dobles enlaces de la molécula (Fig. I.10A). Estas distintas formas mesoméricas posibilitan la formación de distintos tipos de enlaces:  $\beta$ -O-4, 5-O-4,  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ -1 y 5-5, entre otros (Fig. I.10B). Generalmente, los monómeros se van uniendo al polímero de uno en uno por su carbono  $\beta$ , dando lugar, principalmente a enlaces de tipo  $\beta$ -O-4 o  $\beta$ -5, lo que resulta en cadenas lineales de monolignoles (Fig. I.11) (Ralph *et al.* 2004). Este tipo de polimerización por adición de monolignoles en los extremos se ve favorecida por condiciones que ralentizan el proceso, como la baja disponibilidad de sustratos. Esto es lo que ocurre en la pared secundaria, a la que los monolignoles oxidados difunden poco a poco (Ros Barceló *et al.* 2004).

Además de la adición de los monómeros de uno en uno al polímero creciente, los oligómeros de monolignoles también pueden ser oxidados y unirse entre ellos para generar un polímero cada vez mayor (Vanholme *et al.* 2010). Estos oligómeros se unen mediante enlaces de tipo 5-5 y 5-O-4, generando un polímero entrecruzado (Fig. I.11) (Ralph *et al.* 2004). Esta polimerización más rápida se produce en la pared primaria y la lámina media, donde hay una mayor disponibilidad de precursores oxidados, dando lugar a ligninas más condensadas (Ros Barceló *et al.* 2004).

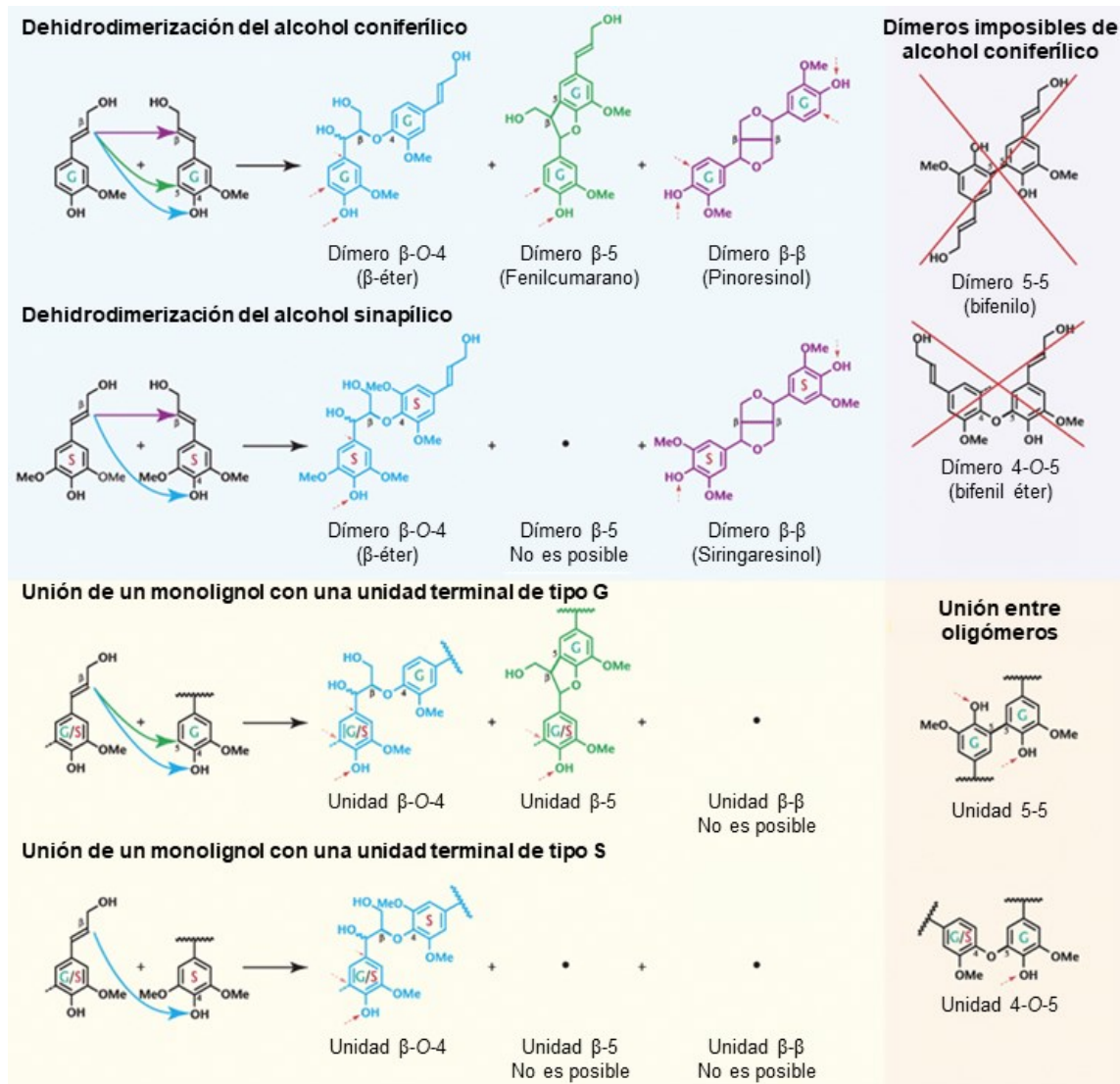


**Figura I.10. Oxidación de los alcoholes hidroxicinamílicos. A. Formas mesoméricas.** Al formarse los radicales fenoxilo el electrón desapareado está deslocalizado entre los distintos dobles enlaces de la molécula, dando lugar a múltiples formas mesoméricas, que van a permitir que se formen diferentes.

R<sub>x</sub>: posición del electrón desapareado. **B. Tipos de enlaces entre unidades.** Las unidades de las ligninas se unen mediante enlaces de tipo éter o carbono-carbono. R<sub>1</sub>-R<sub>6</sub>: diferentes sustituyentes del anillo fenólico en las unidades incorporadas a las ligninas. Modificada de Ros Barceló *et al.* 2004 y Christopher *et al.* 2014.

Para que tenga lugar la formación de un nuevo enlace, las dos moléculas a ser unidas (monómero, oligómeros o polímero) han de estar oxidadas. En el caso de los oligómeros y polímeros, a pesar de su gran tamaño, se ha observado que algunas enzimas son capaces de oxidarlos directamente (Sasaki *et al.* 2004). No obstante, también se ha propuesto que los propios monolignoles, u otros compuestos fenólicos de pequeño tamaño, como el ácido *p*-cumárico, puedan servir de intermediarios en esta oxidación (Boerjan *et al.* 2003).

El tipo de enlaces que se forman está limitado por los monómeros que participan en ellos. Por ejemplo, las unidades S, que presentan un grupo hidroximetilo en su carbono 5, ven restringidas sus posibilidades de formación de enlaces (Fig. I.11), participando mayoritariamente en los de tipo  $\beta$ -O-4. Las ligninas de tipo S, son, por lo tanto, ligninas menos entrecruzadas y más fáciles de degradar, debido a la mayor vulnerabilidad de los enlaces de tipo éter (Ralph *et al.* 2004) y su menor grado de polimerización (Stewart *et al.* 2009).



**Figura I.11. Formación de enlaces entre unidades G y S.** Debido al diferente grado de metoxilación de los alcoholes coniferílico y sinapílico, este último tiene limitada su capacidad para participar en enlaces que impliquen el carbono 5. Como consecuencia las unidades S sólo pueden participar en la formación de enlaces β-O-4 Figura modificada de Ralph *et al.* 2007.

La adición de nuevos monolignoles ocurre de forma combinatorial. Es decir, aunque no hay un control directo sobre qué monómero será el siguiente en unirse y mediante qué tipo de enlace; el crecimiento del polímero sí que está condicionado por la disponibilidad de monolignoles, las concentraciones de los diferentes reactivos, las enzimas disponibles para la oxidación y las condiciones del entorno en el que se está produciendo la reacción (Ralph *et al.* 2004). Es decir, la célula puede ejercer un control sobre estas variables y, por lo tanto, sobre la síntesis de ligninas. Sin embargo, este

proceso presenta siempre cierto grado de aleatoriedad que se refleja en la complejidad de su estructura.

#### 2.2.5. Factores que contribuyen a la complejidad de las ligninas

Dada la flexibilidad de la polimerización oxidativa, el resultado de la misma son polímeros amorfos, sin una estructura definida y cuya composición puede variar en función de las condiciones en las que hayan sido sintetizados. Dada la heterogeneidad en la estructura y composición de las ligninas, se utiliza preferentemente el término en plural, en lugar de lignina, ya que permite englobar las diferentes estructuras presentes en la pared celular (Ralph *et al.* 2004).

A esta heterogeneidad contribuye la diversidad de monómeros disponibles. Si bien las ligninas están formadas principalmente a partir de los tres monolignoles canónicos y que estos tienen preferencia para incorporarse a ellas (Zhao 2016), durante la polimerización pueden sumarse otros monómeros. Es el caso de las unidades C, generadas a partir del alcohol cafeico (Chen *et al.* 2012). Aunque son un componente minoritario, los aldehídos correspondientes a los alcoholes cinamílicos también forman parte de las ligninas y son los responsables de la reacción con el floroglucinol empleada en la tinción de Wiesner (Pomar *et al.* 2002). Los monolignoles, además, pueden sufrir modificaciones ( $\gamma$ -acetilaciones, unión a *p*-benzoato, vanillina, etc.) dando lugar a formas conjugadas de los mismos. Estas también pueden formar parte de las ligninas, siendo especialmente comunes en monocotiledóneas. En algunos casos los monolignoles acetilados suponen más de un 50% de las ligninas de la planta, por lo que algunos autores consideran que hay que pasar a considerar estos monómeros como un precursor más de las ligninas y dejar de diferenciarlos de los canónicos como si su presencia en las ligninas se tratase solo de excepciones puntuales (Boerjan *et al.* 2003). La incorporación de monómeros distintos a los canónicos es totalmente coherente con el modelo combinatorial, ya que esta depende, fundamentalmente, de su disponibilidad y de que existan enzimas capaces de oxidarlos.

Otro factor que añade variabilidad a la estructura de las ligninas es la existencia de los isómeros *eritro* y *treo* en los enlaces  $\beta$ -O-4. El isómero generado depende en gran medida de las unidades que intervengan en el enlace y, también de las condiciones

ambientales en las que se produce la reacción. Durante la formación de los enlaces, se generan centros quirales. Sin embargo, las ligninas no presentan una preferencia por una de las dos configuraciones por lo que incorporan ambas. Las principales consecuencias de esto son que las ligninas son ópticamente inactivas y que con cada nuevo enlace se multiplican las diferentes estructuras que puede presentar el polímero (Ralph *et al.* 2004).

La heterogeneidad en la estructura de las ligninas contribuye a su estabilidad, ya que ha dificultado la aparición de enzimas específicas para su degradación. Las únicas enzimas que catalizan esta reacción son las peroxidasas de clase II fúngicas y algunas lacasas presentes en hongos y bacterias (Pollegioni *et al.* 2015). Por ello, las ligninas constituyen un buen elemento protector frente a ataques físicos, químicos o biológicos.

### 2.3. *Diversidad en la composición de las ligninas*

La gran heterogeneidad en la estructura de las ligninas se manifiesta en las diferencias en la composición de las mismas entre grupos taxonómicos, tipos celulares y estímulos que desencadenan su biosíntesis.

La principal diferencia en la composición de ligninas entre distintas especies se observa entre angiospermas y gimnospermas. Las angiospermas presentan ligninas formadas principalmente por monómeros de tipo G y S, con un ratio que varía en función de la especie. En cambio, las ligninas de gimnospermas están formadas mayoritariamente por grupos G, aunque presentan grupos H en menor cantidad (Boerjan *et al.* 2003). Sin embargo, existen excepciones, como la presencia de monómeros S en las ligninas de cultivos celulares de la gimnosperma *Ginkgo biloba* L. (Novo Uzal *et al.* 2009). Dentro de las angiospermas existe variabilidad interespecífica, habiendo, además, una clara diferencia entre las ligninas de las dicotiledóneas y de las monocotiledóneas; ya que estas últimas, además de unidades G y S, presentan una mayor cantidad de unidades H (Barros *et al.* 2015). En las plantas no vasculares y en algunas algas también se ha detectado la presencia de ligninas de tipo S. Es el caso de algunas especies de briófitos y pteridófitos (Espiñeira *et al.* 2011) y el alga roja *Calliarthron cheilosporioides* Manza (Martone *et al.* 2009). Sin embargo, la enzima responsable de la biosíntesis de alcohol sinapílico (F5H), no tiene un origen común en

todos los taxones, sino que la comparación de las secuencias de estas enzimas entre diferentes taxones sugiere que esta ha aparecido de forma independiente en múltiples ocasiones a lo largo de la evolución vegetal, representando un caso de evolución convergente (Weng *et al.* 2008).

Por otro lado, dentro del mismo individuo se forman ligninas con composiciones diferentes en función del tipo celular. Así, mientras que las ligninas de las fibras de los haces vasculares presentan principalmente ligninas de tipo S, los elementos de los vasos son más ricos en ligninas de tipo G (Barros *et al.* 2015). Esta dicotomía podría tener su origen en que las ligninas ricas en grupos siringilo ofrecen mayor soporte mecánico, mientras que las ligninas con grupos guaiacilo y siringilo, son más resistentes a la degradación gracias a que pueden formar una mayor variedad de enlaces (Weng & Chapple 2010).

El estímulo que desencadena la formación de las ligninas también condiciona su composición, adaptando las propiedades de las ligninas a las necesidades del tejido en cada caso. Así, las ligninas producidas como respuesta a estrés (madera de compresión y tensión, heridas, ataques de patógenos) presentan también una composición característica (Boerjan *et al.* 2003; Menden *et al.* 2007).

#### *2.4. Relevancia económica de la lignificación*

Las paredes vegetales sirven como materia prima en diferentes industrias: alimentaria, textil, papelera, forrajera, energética, etc. Por ello, es interesante conocer su estructura y biosíntesis para poder actuar sobre ella y alterar su composición para maximizar el rendimiento (Carpita *et al.* 2015).

La eliminación de ligninas de los materiales lignocelulósicos es un objetivo común a varias industrias para aumentar el rendimiento de sus procesos y reducir su impacto ambiental. Tanto en la fabricación de papel como en la obtención de forrajes y biocombustibles, la presencia de ligninas es un problema a superar. En este último caso, por ejemplo, las ligninas dificultan el acceso de las enzimas que degradan los polisacáridos de pared reduciendo la obtención de monosacáridos fermentables (sacarificación) (Albersheim *et al.* 2011). La enorme plasticidad que se ha observado en la biosíntesis de ligninas representa una ventaja a la hora de introducir modificaciones en la estructura de las ligninas que permitan facilitar su eliminación



(Ralph *et al.* 2004). Con este objetivo se han propuesto diferentes estrategias: reducir el grado de polimerización, reducir la hidrofobicidad de las ligninas, reducir los enlaces entre ligninas y carbohidratos de pared y aumentar la proporción de los enlaces más lábiles. Estos objetivos pueden lograrse introduciendo o reprimiendo genes específicos implicados en la biosíntesis de las ligninas, o bien, actuando sobre los mecanismos de control transcripcional de este proceso (Mottiar *et al.* 2016).

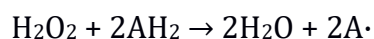
Las técnicas de ingeniería genética permiten, además, llevar a cabo modificaciones dirigidas de la biosíntesis de las ligninas, afectando únicamente a tipos celulares concretos mediante el uso de promotores específicos, reduciendo el impacto sobre el crecimiento de la planta (Smith *et al.* 2017; Yang *et al.* 2013).

No obstante, la obtención de plantas con una ruta de biosíntesis de ligninas alteradas ha tenido como resultado, en múltiples ocasiones, plantas con fenotipos enanos u otros problemas de crecimiento que reducen la producción. Esto se debe, por una parte, a los cambios en la estructura de las ligninas o a la ausencia de la misma y, por otra, a los efectos colaterales en otras rutas de biosíntesis o a la acumulación de intermediarios (Anterola & Lewis 2002; Bonawitz & Chapple 2013).

En definitiva, el estudio detallado de la biosíntesis de ligninas permitirá mejorar las posibilidades de modificación de la misma para diferentes aplicaciones industriales.

### 3. Peroxidasas

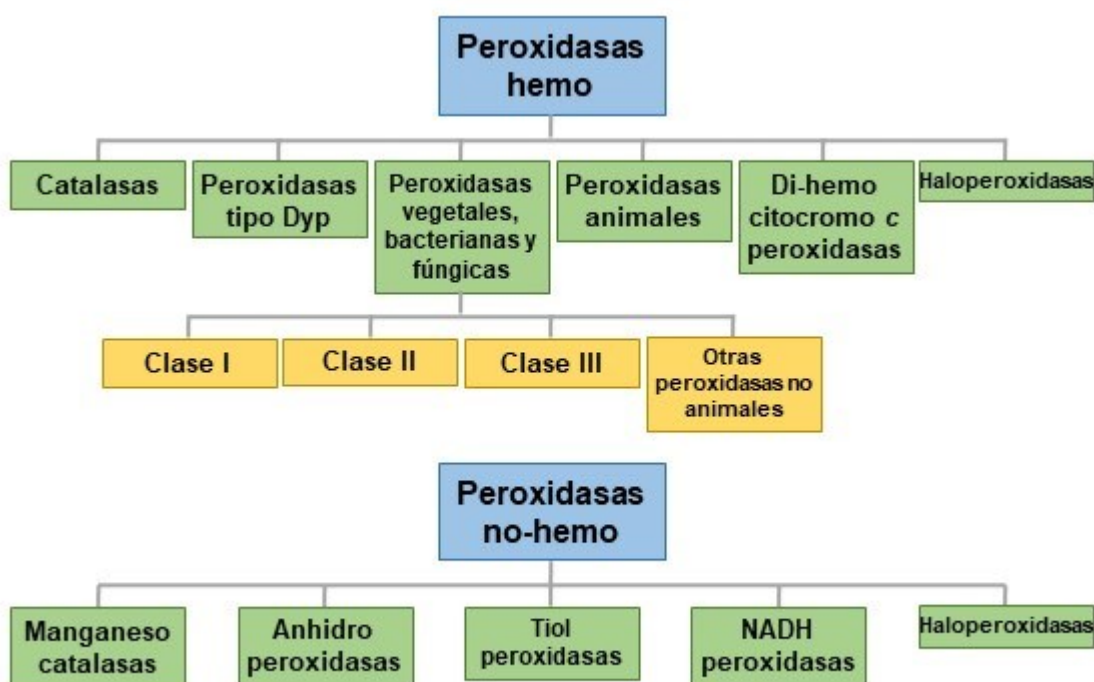
Las peroxidasas (EC 1.11.1) son enzimas que catalizan una reacción de óxido-reducción en la que se consume una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar a un compuesto reductor (Oliva *et al.* 2009).



#### 3.1. Clasificación

La primera gran división dentro de las peroxidasas se basa en el grupo prostético que presentan: hemo o no-hemo (Fig. I.12). Las peroxidasas de tipo hemo se clasifican, a su vez, en dos grandes superfamilias: peroxidasas animales (peroxidasas-ciclooxigenasa) y no animales (peroxidasas-catalasa); y tres familias (di hemo peroxidasas, peroxidasas hemo tipo Dyp y haloperoxidasas) (Zámocky & Obinger 2010).

La superfamilia peroxidasa-catalasa, o de peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas, reúne enzimas con una amplia variedad de secuencias, sustratos y distribución taxonómica. Sin embargo, en la estructura terciaria de todas estas enzimas se conservan 10  $\alpha$ -hélices. Comparten, también, el mismo grupo prostético, ferriprotoporfirina IX (Fig. I.13A) y todas ellas presentan tres residuos conservados que forman parte del centro activo: una histidina en el sitio proximal de unión a hemo y una arginina y una histidina en el sitio distal. Dentro de esta superfamilia se diferencian tres clases principales (Welinder 1992):



**Figura I.12. Clasificación de las peroxidasas.** Las peroxidasas se dividen en función de su grupo prostético, si es o no hemo. Dentro de las peroxidasas hemo se diferencian familias y dos superfamilias: las animales (peroxidasa-ciclooxigenasa) y las vegetales, bacterianas y fúngicas (peroxidasa-catalasa).

Figura modificada de la web PeroxiBase (Fawal *et al.* 2013).

- Clase I: incluye ascorbato peroxidasas (EC 1.11.1.11), citocromo *c* peroxidasas de levaduras (EC 1.11.1.5) y peroxidasas-catalasas bacterianas (EC 1.11.1.6). Son enzimas encargadas de eliminar el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células. En este grupo se encuentran los representantes más antiguos de la superfamilia (Zámocky & Obinger 2010).

- Clase II: comprende enzimas fúngicas extracelulares implicadas en la degradación de ligninas. Se diferencian tres grupos: lignin-peroxidasas (EC 1.11.1.14), peroxidasas dependientes de  $Mn^{+2}$  (EC 1.11.1.13) y peroxidasas versátiles (EC 1.11.1.16) (Zámocky & Obinger 2010).
- Clase III: peroxidasas vegetales de secreción y vacuolares (EC 1.11.1.7). Estas enzimas presentan una especificidad de sustrato muy amplia y están implicadas en múltiples procesos fisiológicos en las plantas (Zámocky & Obinger 2010).

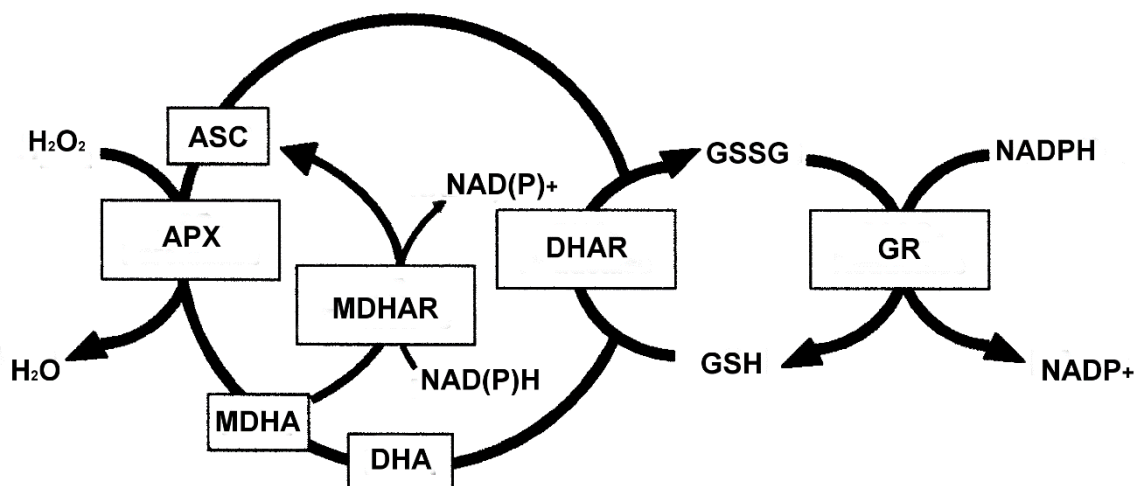
### 3.2. Control de los niveles de ROS

El punto común de este tipo de enzimas es su capacidad para consumir  $H_2O_2$  en sus reacciones al emplearlo como oxidante, contribuyendo a la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta función es especialmente relevante en las plantas, ya que debido a la producción de oxígeno molecular durante la fotosíntesis y su uso como oxidante en algunos procesos celulares, presentan unos niveles de ROS más elevados que otros grupos taxonómicos (De Gara *et al.* 2010). Por ello, el control sobre el estado de óxido-reducción de los diferentes compartimentos celulares es fundamental para la fisiología de la planta y su protección frente al estrés oxidativo. Las plantas cuentan con diversos mecanismos que les permiten percibir la presencia de ROS y emplearlas como sistema de señalización frente a múltiples estímulos o como sustratos para diferentes reacciones de su metabolismo (Foyer & Noctor 2005).

En el interior celular el estado redox está fuertemente tamponado gracias a la acción de diversas enzimas y compuestos antioxidantes como los que forman el ciclo del ascorbato-glutación (Pignocchi & Foyer 2003). Este ciclo consta de cuatro enzimas (ascorbato peroxidasa –EC 1.11.1.11–, MDHAR-reductasa –EC 1.6.5.4–, DHA-reductasa –EC 1.8.5.1– y glutación reductasa –EC 1.8.1.7–) y de cuatro sustratos en sus formas oxidadas y reducidas (ascorbato, glutación, NADH y NADPH) (Fig. I.13) (De Gara *et al.* 2010). La relación entre las formas oxidadas y reducidas del ascorbato y el glutación y la actividad enzimática de las enzimas implicadas en este ciclo pueden verse alteradas como respuesta a diferentes tipos de estrés (Locato *et al.* 2008).

El ascorbato reducido, además, puede ser exportado al citosol donde contribuye al control de los niveles de  $O_2$ , gracias al papel de la enzima ascorbato oxidasa (EC

1.10.3.3). El ascorbato oxidado por esta enzima entra al citosol donde puede ser reducido por las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión (Foyer & Noctor 2013). De esta forma, este sistema contribuye también al control del estado redox del apoplasto (Pignocchi & Foyer 2003). Además, las ROS producidas en el apoplasto pueden desencadenar respuestas intracelulares al entrar en la célula. Este es el caso del  $H_2O_2$ , capaz de atravesar la membrana plasmática a través de acuaporinas (Tian *et al.* 2016).



**Figura I.13. Ciclo ascorbato-glutatión.** Este sistema antioxidante regula los niveles de ROS en la célula. Se inicia con la eliminación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) gracias a la acción de la enzima ascorbato peroxidasa (APX: EC 1.11.1.11). Esta enzima oxida el ácido ascórbico (ASC) a monodehidroascorbato (MDHA). Este sustrato puede reducirse de nuevo a ascorbato gracias a la acción de la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR: EC 1.6.5.4), que consume NAD(P)H en su reacción. El MDHA también puede oxidarse de forma espontánea a dehidroascorbato (DHA). Este es el sustrato de la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR: EC 1.8.5.1), capaz de oxidar este sustrato a ácido ascórbico (ASC) mientras oxida glutatión (GSH). La forma oxidada del glutatión (GSSG) puede ser reciclada a GSH por la enzima glutatión reductasa (GR: EC 1.8.1.7), que necesita NADPH para su reacción. Figura modificada de De Gara 2004.

La acción antioxidante del ciclo ascorbato-glutatión es complementada por la acción de diferentes enzimas clasificadas como peroxidasas: las peroxidasas de clase III presentes en apoplasto y vacuolas (EC 1.11.1.7) (Francoz *et al.* 2015), las glutatión peroxidasas localizadas en el citosol, mitocondrias y cloroplastos (EC 1.11.1.9) (Margis *et al.* 2008) y las catalasas presentes en los peroxisomas (EC 1.11.1.6) (Feierabend 2005).

### 3.3. Peroxidasas de clase III

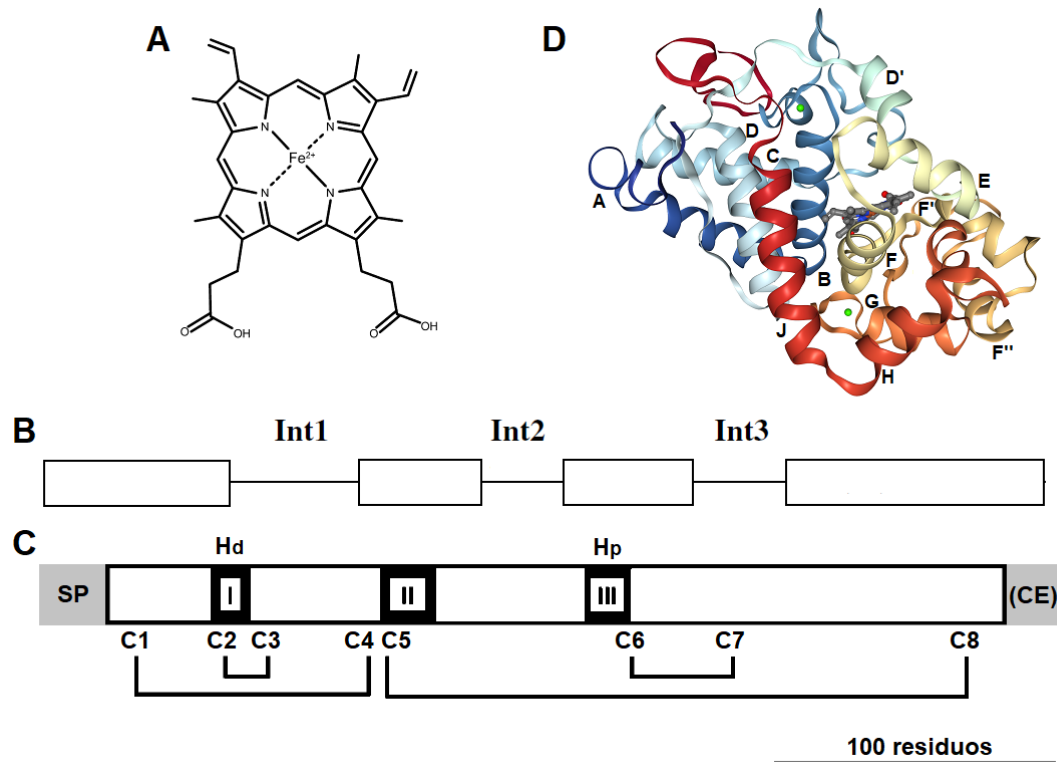
Las peroxidasas de clase III (EC 1.11.1.7) son glucoproteínas de secreción con un grupo hemo como grupo prostético (Zámocky & Obinger 2010). Estas enzimas se caracterizan por ser estables térmicamente y por ser capaces de oxidar una gran variedad de sustratos (Hiraga *et al.* 2001). En función de su punto isoeléctrico (pI) se clasifican en ácidas (pI < 7) o básicas (pI > 7) (Ros Barceló *et al.* 1998).

Estas enzimas están presentes en todas las plantas terrestres. En la mayoría de las angiospermas ha aumentado enormemente su número debido a eventos de duplicación, bien en tándem o bien que afectaron a una importante parte del genoma (Ren *et al.* 2014). Los genes duplicados se han conservado con más o menos mutaciones que afectan tanto a su capacidad catalítica como a su localización subcelular (Ren *et al.* 2014); como consecuencia estos genes han podido mantener su función o pasar a desempeñarla en un tejido diferente (subfuncionalización) o, incluso, han pasado a desarrollar funciones nuevas (neofuncionalización), mientras que otros se han convertido en pseudogenes (Passardi *et al.* 2004a). El resultado es el gran número de peroxidasas de clase III que presentan las plantas modernas. Así en PeroxiBase (Fawal *et al.* 2013) hay 75 registros de este tipo de peroxidasas para *A. thaliana*, 103 para *Medicago truncatula* Gaernt., 147 para *Nicotiana tabacum* L., 101 para *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex. Hook. y 97 para *Vitis vinifera* L.

Se han encontrado enzimas con alguno de los motivos típicos de peroxidasas de clase III en algas verdes y rojas que podrían representar una forma intermedia entre ellas y las citocromo *c* peroxidasas de clase I, a partir de las que se originaron (Passardi *et al.* 2007). Sin embargo, todo apunta a que la aparición y gran radiación de las peroxidasas de clase III se produjo en las plantas terrestres, aportando ventajas adaptativas en el nuevo ambiente (Duroux & Welinder 2003).

#### 3.3.1. Estructura génica y proteica

En *A. thaliana*, la mayoría de los genes que codifican peroxidasas de clase III presentan cuatro exones separados por tres intrones cuya localización está conservada (Fig. I.14B) (Welinder *et al.* 2002). En especies de monocotiledóneas como *Oryza sativa* L. la estructura del gen es más variada, existiendo hasta 12 patrones diferentes de



**Figura I.14. Elementos de las peroxidadas de clase III.** **A. Grupo hemo.** El grupo prostético de estas enzimas es la protoporfirina IX. **B. Estructura génica de las peroxidadas.** Un gen típico de una peroxidada de clase III presenta tres intrones y cuatro exones. **C. Esquema de la cadena polipeptídica de las peroxidadas.** Presentan un péptido señal en el extremo *N*-terminal (SP) que es eliminado de la estructura final. Las peroxidadas de vacuola presentan, además, un péptido C-terminal (CE) necesario para su transporte a la vacuola. Presentan varios dominios conservados (cajas negras). Hd: dominio de unión a hemo distal. Hp: dominio de unión a hemo proximal. Las peroxidadas de clase III presentan 8 cisteínas (C1-C8) conservadas, implicadas en la formación de cuatro puentes disulfuro. **D. Estructura terciaria de las peroxidadas de clase III.** Estas enzimas presentan una estructura con hasta 13  $\alpha$ -hélices (A-J) (de azul a rojo). Entre sus hélices B y E se encuentra el grupo hemo (gris) que se localiza entre los dominios distal y proximal, cada uno de los cuales presenta un sitio de unión a calcio (verde). Figuras modificadas de Busch & Montgomery 2015, Passardi *et al.* 2004a, Hiraga *et al.* 2001 y Rose *et al.* 2018.

ordenación de exones e intrones (Passardi *et al.* 2004a). El tamaño de los intrones parece haber ido aumentando a lo largo de la evolución de las plantas vasculares, como sugiere que especies más antiguas como *G. biloba* presenten intrones más cortos (Novo-Uzal *et al.* 2014).

Las peroxidadas de clase III cuentan con un péptido señal que las dirige hacia la vía de secreción (Fig. I.14C) (Welinder 1992). Como consecuencia, la mayoría de este

tipo de peroxidasas en *A. thaliana* se localizan en fracciones extracelulares o de membrana, mientras que el resto se encuentran en fracciones de vacuola (Francoz *et al.* 2015). De hecho, en la pared celular pueden llegar a representar el 6% de las proteínas (Jamet *et al.* 2006). Las peroxidasas de vacuola presentan, además, un dominio C-terminal (Carter *et al.* 2004), que presenta una hélice anfipática que facilita la salida del retículo endoplasmático de estas enzimas (Matsui *et al.* 2011). Ambos dominios de localización subcelular son eliminados de la estructura madura de la proteína.

La resolución de estructura terciaria de algunas peroxidasas de clase III empleando difracción de rayos X (Morita *et al.* 1991; Østergaard *et al.* 2000; Schuller *et al.* 1996; Watanabe *et al.* 2010) ha permitido observar que estas presentan entre 12 y 13  $\alpha$ -hélices (Fig. I.14D). Las hélices de la A a la J son comunes con las peroxidasas de clase I y II. Sin embargo, la mayoría de las peroxidasas de clase III carecen de la  $\alpha$ -hélice B' y, en su lugar, presentan un bucle superficial que puede estar N-glucosilado. Las tres  $\alpha$ -hélices adicionales (D', F' y F'') de las peroxidasas de clase III se localizan en la región con mayor variabilidad entre las distintas clases de las peroxidasas de esta superfamilia (Schuller *et al.* 1996). El estudio de estas estructuras y la identificación de residuos conservados ha permitido reconocer motivos conservados de importancia para la función enzimática: el centro activo, sitios de unión a calcio y cisteínas implicadas en la formación de puentes disulfuro.

El centro activo está conformado por aminoácidos que, a pesar de no estar próximos en la estructura primaria de la proteína, se localizan en torno al grupo hemo. Siguiendo la numeración de la peroxidasa C de rábano, los residuos más relevantes son Arg38, His42 y Asn70, que conforman el sitio distal de unión a hemo; el grupo carbonilo de la Pro139 y los aminoácidos His170 y Asp247, que forman el sitio proximal de unión a hemo (Welinder *et al.* 2002). Es de destacar que el centro activo no presenta residuos que permitan establecer una unión específica con el sustrato reductor, lo que seguramente contribuye a la amplia variedad de sustratos que este tipo de enzimas son capaces de oxidar (Schuller *et al.* 1996).

Estas enzimas presentan varios motivos conservados relevantes para el mantenimiento de su estructura terciaria. Este es el caso de los aminoácidos implicados en el puente salino que conecta el principio de la hélice D con el bucle que la sigue y

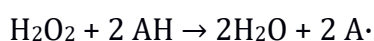
que también están conservados en las peroxidasas de tipo I y II (Welinder *et al.* 1992). Todas las peroxidasas de clase III presentan, además, dos sitios de unión a  $\text{Ca}^{+2}$ , uno en el dominio distal y otro en el proximal (Fig. I.14D). Estos sitios consisten en dos aminoácidos ácidos cargados negativamente (aspartato o glutamato) y uno o dos grupos hidroxilo aportados por una serina o una treonina. También son de gran importancia las 8 cisteínas conservadas (Fig. I.14C) que están implicadas en la formación de cuatro puentes disulfuro (Welinder *et al.* 2002).

Las peroxidasas de clase III presentan varias secuencias que pueden ser *N*-glucosiladas (NXS/T), aunque el número de glucosilaciones reales varía en función de la isoenzima. Estas suelen encontrarse principalmente en la superficie de las hélices o en las regiones de bucle (Watanabe *et al.* 2010; Welinder *et al.* 2002). En ocasiones, un mismo polipéptido puede presentar varios patrones de glucosilación (Gabaldón *et al.* 2007; Laugesen *et al.* 2007), contribuyendo a aumentar todavía más el número de posibles isoenzimas.

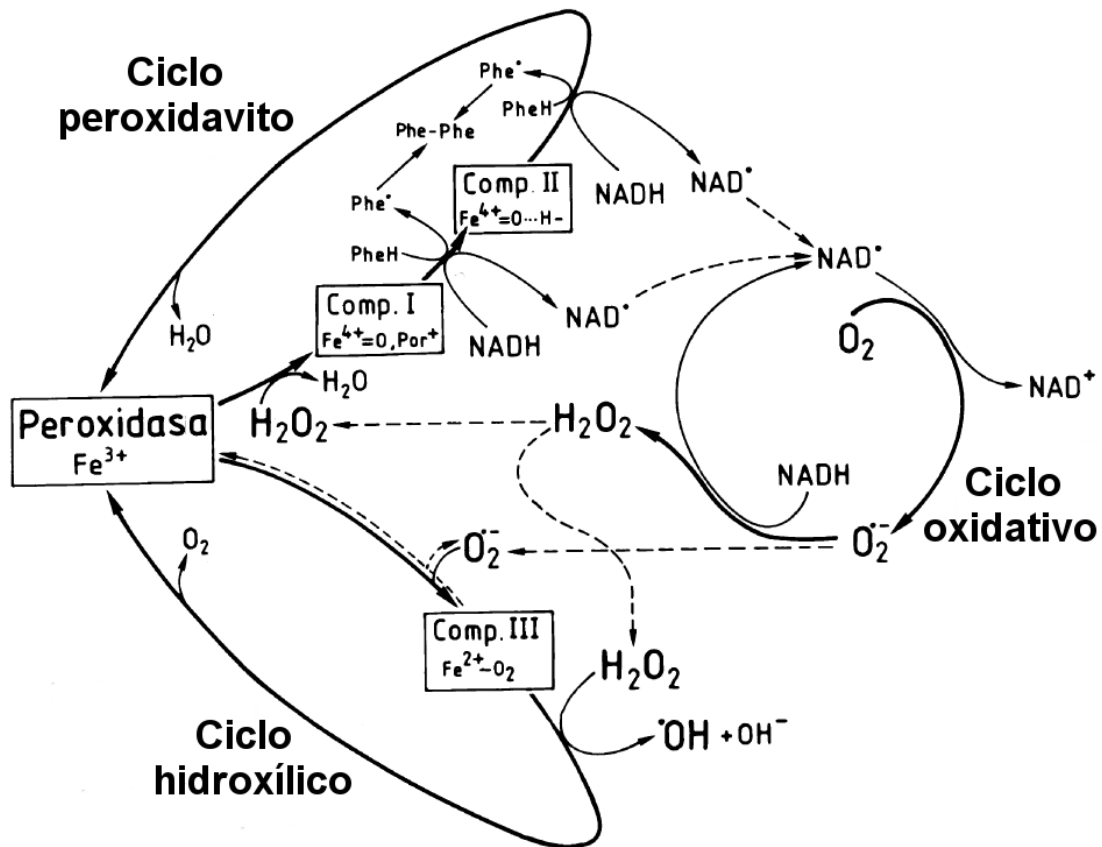
### 3.3.2. Mecanismo de acción y reacciones

Las peroxidasas de clase III son capaces de oxidar diversos sustratos a expensas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en su ciclo peroxidativo normal. Además, cuando reacciona con sustratos concretos, estas enzimas pueden presentar un ciclo diferente, denominado hidroxílico, en el que se generan especies reactivas de oxígeno (Passardi *et al.* 2004b; Shigeto & Tsutsumi 2016).

El ciclo peroxidativo (Fig. I.15) se inicia cuando una molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entra en el sitio distal de unión a hemo de la enzima en reposo (E) en la que el grupo hemo presenta  $\text{Fe}^{+3}$ . El peróxido se une al átomo de hierro de forma transitoria formando el compuesto 0 (C0). Este se degrada rápidamente para dar lugar el compuesto I (CI) y a una molécula de agua. En el CI un átomo de oxígeno procedente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  está unido al grupo hemo ( $\text{Fe}^{+4}$ ). En este estado, la enzima es capaz de oxidar de forma secuencial dos moléculas de un sustrato reductor. Tras la oxidación de la primera se forma el compuesto II (CII) y tras la oxidación de la segunda la enzima vuelve a su estado de reposo (E) y se libera una segunda molécula de agua. Los dos sustratos reductores pierden un electrón cada uno dando lugar a radicales oxidados (Fig. I.15) (Longu *et al.* 2004).

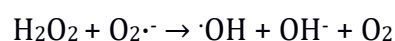






**Figura I.15. Ciclos catalíticos de las peroxididasas de clase III.** **Ciclo peroxidativo:** oxidación sustratos fenólicos (PheH) a expensas de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) generando radicales libres (Phe·). **Ciclo oxidativo:** los radicales libres capaces de reaccionar con el oxígeno, como el  $\text{NAD}^\cdot$ , pueden iniciar una reacción en cadena sin necesidad de catálisis enzimática en el que se genera ion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). **Ciclo hidroxílico:** el ion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pueden ser convertidos por las peroxididasas en radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), iones hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y  $\text{O}_2$ . Figura modificada de Chen & Schopfer 1999.

Por otro lado, en su ciclo ciclo hidroxílico (Fig. I.15) las peroxididasas de este grupo pueden generar ROS. La oxidación de algunos sustratos como el NADPH (Liszky *et al.* 2003) o el NADH (Chen & Schopfer 1999), dan lugar a radicales que pueden reaccionar espontáneamente con el oxígeno molecular dando lugar al radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (Yokota & Yamazaki 1965). Este radical puede reaccionar con la enzima en reposo (E) dando lugar al compuesto III (CIII), que es capaz de producir  $\text{O}_2$ , ion hidróxido ( $\text{OH}^-$ ), radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) o radical hidroperoxilo ( $\cdot\text{OOH}$ ) (Fig. I.15) (Shigeto & Tsutsumi 2016; Passardi *et al.* 2004b), de acuerdo a la reacción de Haber-Weiss (Chen & Schopfer 1999):



Por lo tanto, las peroxidasas de clase III pueden contribuir a la eliminación de ROS, al degradar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero también pueden contribuir a su formación. Esto dependerá de las condiciones en las que se da la reacción (pH, disponibilidad de O<sub>2</sub>), la isoforma de peroxidasa implicada y de los sustratos disponibles para oxidar.

### 3.3.3. Diversidad de funciones

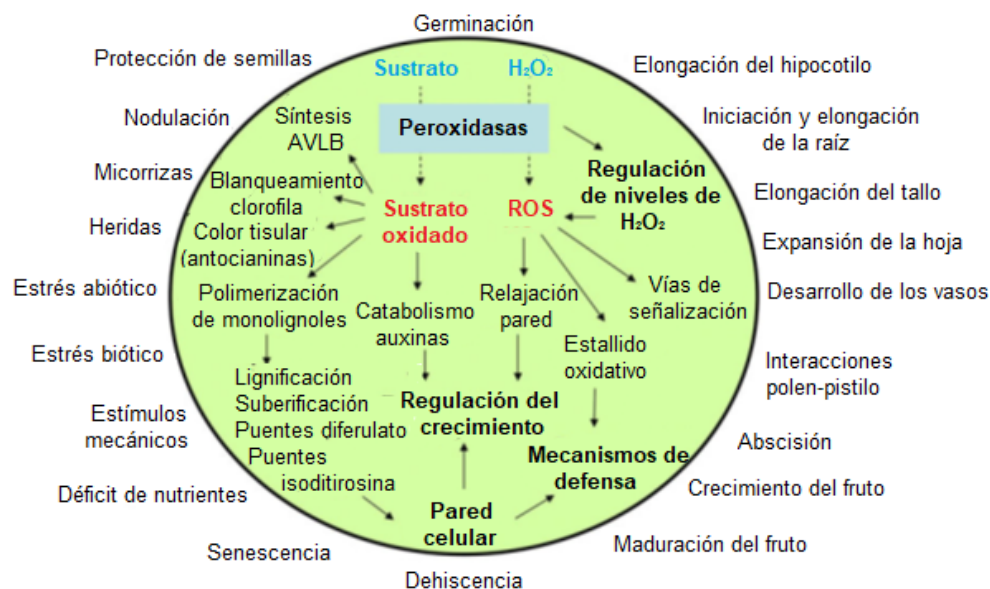
Las peroxidasas de clase III intervienen en un gran número de procesos fisiológicos vegetales (Cosio & Dunand 2009; Passardi *et al.* 2005; Shigeto & Tsutsumi 2016). Esta diversidad funcional se debe a la combinación de dos ciclos catalíticos distintos, a la falta de especificidad en los sustratos que son capaces de oxidar y a que los genomas vegetales codifican un elevado número de isoenzimas de esta familia que ha permitido la subfuncionalización y neofuncionalización (Passardi *et al.* 2005). En *A. thaliana* se ha observado que las enzimas con mayor similitud en su secuencia primaria presentan patrones diferentes de expresión, lo que apoya la idea de la subfuncionalización de las distintas isoenzimas, especializándose en distintos tejidos (Welinder *et al.* 2002).

Se ha detectado su expresión en todo tipo de tejidos vegetales y en diferentes estados de desarrollo y se ha constatado su participación en la germinación, la diferenciación de tejidos, el crecimiento celular, la respuesta a patógenos, a heridas y a distintos tipos de estrés abiótico (Fig. I.16) (Francoz *et al.* 2015; Passardi *et al.* 2005).

Las peroxidasas de clase III también están implicadas en el catabolismo de las auxinas (Cosio *et al.* 2009). Como consecuencia están implicadas en la regulación de eventos del desarrollo vegetal que dependen de estas fitohormonas como la formación de raíces (Vatulescu *et al.* 2004). Además, la oxidación peroxidativa del ácido indolacético en la pared celular tiene como consecuencia la activación del ciclo hidroxílico y, por lo tanto, la producción de ROS que favorecen la relajación de la pared (Schopfer *et al.* 2002).

Algunas peroxidasas de clase III se expresan en respuesta a estrés, tanto biótico como abiótico. Se ha visto que estas enzimas son de gran importancia en la resistencia a patógenos (Almagro *et al.* 2009), en la defensa frente a herbívoros (Scully *et al.* 2016) y también están implicadas en las interacciones simbióticas con microorganismos

(Passardi *et al.* 2005) y en la respuesta tras la formación de heridas en la planta (Minibayeva *et al.* 2015).



**Figura I.16. Funciones de las peroxidasas de clase III.** Las peroxidasas de clase III intervienen en numerosos procesos fisiológicos de la planta gracias a sus dos ciclos catalíticos, que le permiten oxidar diferentes sustratos (monolignoles, ácido ferúlico, tirosina, ácido indolacético, antocianinas, etc.) y participar en la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), desencadenando cascadas de señalización. Figura modificada de Cosio & Dunand 2009.

En cuanto al estrés abiótico, se han identificado múltiples peroxidasas que se expresan como respuesta a la exposición a metales, a ozono, a bajas temperaturas, a deshidratación, a altas concentración de sales o al déficit de nutrientes (Cosio & Dunand 2009; Shigeto & Tsutsumi 2016).

Es de destacar su relevancia en la biosíntesis y modificación de componentes de la pared celular, sobre la que pueden ejercer efectos antagónicos (Passardi *et al.* 2004b). Por un lado, gracias a su capacidad peroxidativa, las peroxidasas de clase III son capaces de oxidar diferentes sustratos contribuyendo al endurecimiento de la pared. Es el caso de la biosíntesis de ligninas (Cosio *et al.* 2017), el entrecruzamiento de extensinas (Jackson *et al.* 2001, Dong *et al.* 2015), la formación de puentes diferulato (Wakabayashi *et al.* 2012) o la biosíntesis de suberina (Bernards *et al.* 1999). Por otro lado, debido a que son capaces de producir radicales hidroxilo (Liszky *et al.* 2003), pueden favorecer la relajación de la pared. Estos radicales pueden romper las uniones entre polisacáridos de pared, favoreciendo su separación y que se intercalen

materiales nuevos entre ellos, posibilitando, así, la extensión de la pared y el crecimiento de la célula (Schopfer 2001).

### *Papel en la lignificación*

Múltiples peroxidasas de clase III se han relacionado con la biosíntesis de ligninas (Tabla I.1) (Marjamaa *et al.* 2009). Para participar en esta función las peroxidasas han de estar presentes en la pared de células que sufran lignificación y ser capaces de oxidar los monolignoles.

Dado que las peroxidasas de clase III están principalmente presentes en la pared celular, cumplen con el requisito de coincidir en el espacio con la polimerización de las ligninas. Además, para muchas de las peroxidasas para las que se ha propuesto un papel en este proceso existen estudios de su patrón de expresión que las han localizado en tejidos sometidos a lignificación o se han aislado a partir de ellos (Gabaldón *et al.* 2005; Koutaniemi *et al.* 2007; Li *et al.* 2003a; Østergaard *et al.* 2000; Sasaki *et al.* 2006; Sato *et al.* 2006). En estos tejidos también hay una producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, necesario para el ciclo peroxidativo de estas enzimas (Gómez-Ros *et al.* 2007a)

La interacción de peroxidasas de clase III con diferentes sustratos se ha estudiado gracias a modelos tridimensionales obtenidos a partir de datos de difracción de rayos X. En el año 2000, Østergaard *et al.* observaron que la peroxidasa ácida AtP A2 de *A. thaliana* puede albergar en su centro activo los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico. Sin embargo, esto no es posible para el alcohol sinapílico, debido a incompatibilidades estéricas entre la Ile138 y la Pro139 del centro activo y el grupo hidroximetilo del carbono 5 de este monolignol (Østergaard *et al.* 2000). Este no es un caso aislado, sino que hay más peroxidasas de clase III que son incapaces de oxidar el alcohol sinapílico, como la peroxidasa A2 de rábano. Sin embargo, esta enzima es capaz de oxidar el alcohol sinapílico en presencia de alcohol coniferílico. En base a esto puede deducirse que la enzima oxida el segundo de estos sustratos que, a continuación, transfiere su electrón desapareado al primero, oxidándolo. Siendo posible así una oxidación indirecta del alcohol sinapílico (Sasaki *et al.* 2004).

Sin embargo, también existen peroxidasas de clase III, las siringil-peroxidasas o de tipo S (Gabaldón *et al.* 2006), capaces de oxidar directamente el alcohol sinapílico o sus análogos (Aoyama *et al.* 2002; Christensen *et al.* 2001; Gabaldón *et al.* 2005;

Marjamaa *et al.* 2006; Martínez-Cortés *et al.* 2012; Ros Barceló & Pomar 2001; Sato *et al.* 2006). El alineamiento de secuencias de este tipo de peroxidadas y su comparación con peroxidadas de tipo G, aquellas incapaces de oxidar el alcohol sinapílico, ha permitido identificar motivos y aminoácidos característicos de este tipo de enzimas (Fig. I.17A). Estas peroxidadas se caracterizan por ser de carácter básico, mientras que las de tipo G suelen ser peroxidadas ácidas (Gómez-Ros *et al.* 2007a, 2007b).

Las diferencias en la estructura primaria entre las peroxidadas de tipo G y S se traducen en estructuras secundarias y terciarias diferentes. Así, las peroxidadas de tipo S carecen de la hélice D' (Fig. I.17B), que se encuentra a la entrada del sitio activo de la enzima (Gabaldón *et al.* 2007). Esta hélice precede a los aminoácidos Ile138 y Pro139, responsables de las incompatibilidades estéricas con el alcohol sinapílico (Østergaard *et al.* 2000). Este cambio, por lo tanto, supone una mayor apertura del centro activo y, en consecuencia, es responsable de la capacidad de estas enzimas de oxidar sustratos como el alcohol sinapílico (Gabaldón *et al.* 2007).

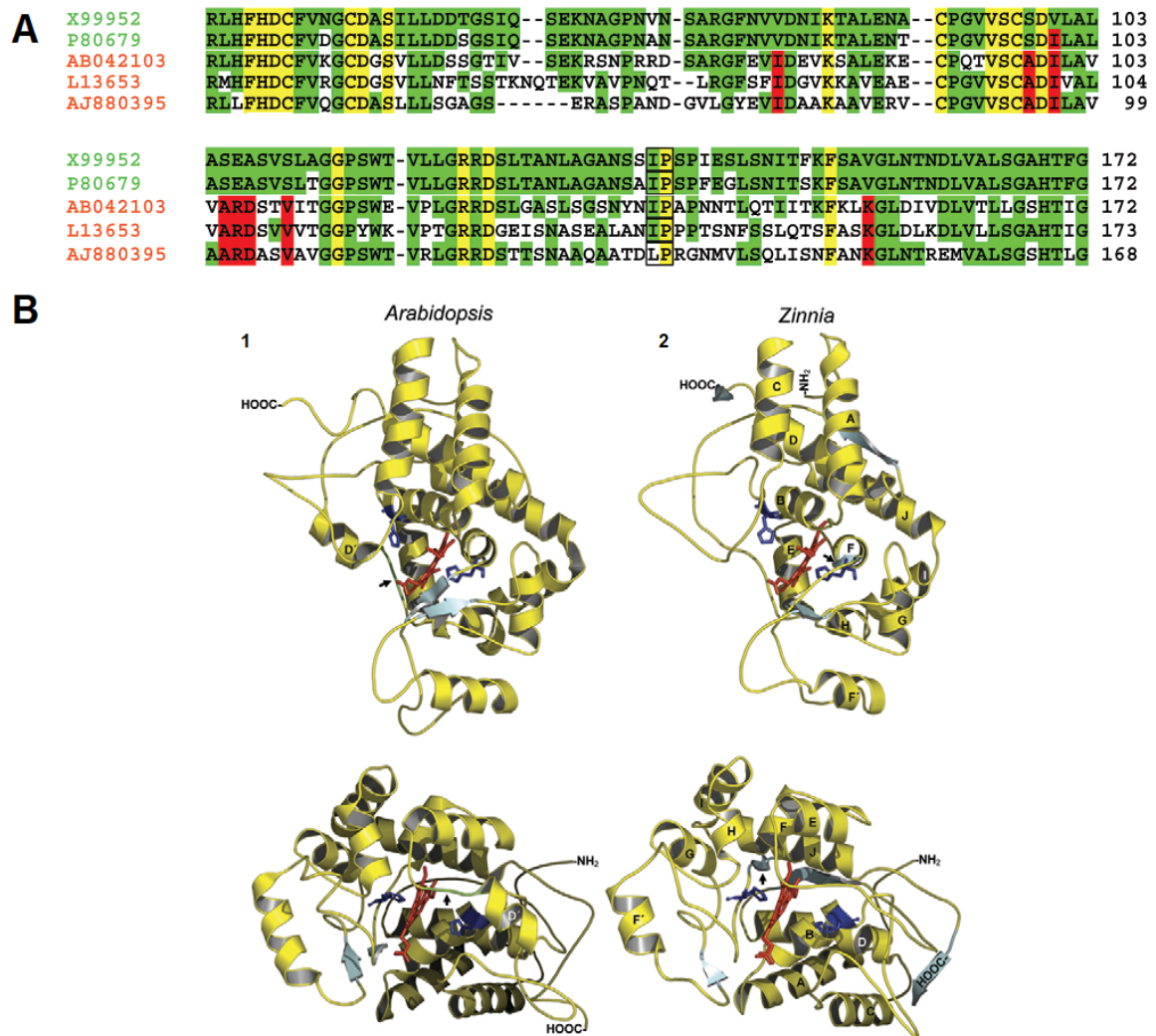
Es especialmente llamativa la falta de correspondencia entre la presencia de peroxidadas de tipo S y ligninas de tipo siringilo. Existen especies que carecen de este tipo de enzimas pero incorporan unidades S a sus ligninas gracias a la mediación del alcohol coniferílico en la oxidación (Sasaki *et al.* 2004). Por otro lado, la presencia de peroxidadas de tipo S en especies que no presentan ligninas de tipo siringilo (Gómez-Ros *et al.* 2007b) sugiere que estas enzimas son previas a la aparición de la ruta de biosíntesis del alcohol sinapílico y que su versatilidad podría haber favorecido la incorporación de nuevos monómeros a las ligninas con la aparición de dicha ruta (Ros Barceló *et al.* 2004).

Se ha comprobado, además, que algunas peroxidadas son capaces de oxidar también polímeros de ligninas, generando las formas radicales necesarias para que se incorporen monolignoles adicionales (Sasaki *et al.* 2004). Esta actividad es necesaria, especialmente, en la polimerización lineal que se producen en la pared secundaria, por adición de monolignoles a los polímeros crecientes.

**Caracterización funcional de la última etapa de la biosíntesis de ligninas mediante la sobreexpresión de peroxidasas en plantas modelo**

**Tabla I.1. Peroxidasas de clase III implicadas en lignificación.** Ejemplos de algunas peroxidasas de clase III que se han relacionado con la biosíntesis de ligninas en diferentes especies (*A. thaliana*, *Betula pendula* Roth., *N. tabacum*, *Picea abies* (L.) H. Karst., *Populus alba* L., *Populus sieboldii* x *Populus gradidentata*, *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex. Hook., *Solanum lycopersicum* L. y *Z. elegans*)

Especie	Enzima	Evidencias	Referencia
<i>A. thaliana</i>	ATP A2	Colocalización con lignificación y capacidad de oxidar monolignoles	Østergaard <i>et al.</i> 2000
	AtPrx2 AtPrx25 AtPrx71	Reducción de ligninas totales y aumento del ratio S/G en mutantes con inserción de T-DNA	Shigeto <i>et al.</i> 2015
	AtPrx4	Reducción de ligninas totales y siringilo en mutantes con inserción de T-DNA	Fernández-Pérez <i>et al.</i> 2015
	AtPrx17	Aumento de las ligninas totales en transformantes de sobreexpresión y reducción de ligninas totales en mutantes con inserción de T-DNA	Cosio <i>et al.</i> 2017
	AtPrx52	Reducción de ligninas totales y siringilo en mutantes con inserción de T-DNA	Fernández-Pérez <i>et al.</i> 2014
	AtPrx64	Desarrollo tardío de la endodermis en transformantes con un iRNA específico	Lee <i>et al.</i> 2013
	AtPrx72	Reducción de ligninas totales y siringilo en mutantes con inserción de T-DNA	Herrero <i>et al.</i> 2013
<i>B. pendula</i>	BPX1 BPX2 BPX3	Capacidad de oxidar monolignoles	Marjamaa <i>et al.</i> 2006
<i>N. tabacum</i>	NtPrx60	Reducción de ligninas en transformantes con un iRNA específico	Blee <i>et al.</i> 2003
	Peroxidasa aniónica	Reducción de ligninas tras una lesión en transformantes con un iRNA específico	Lagrimini <i>et al.</i> 1997
<i>P. abies</i>	PaPX2 PaPX3 PaPX8 PaPX9 PaPX13 PaPX14	Colocalización con lignificación propia del desarrollo y en respuesta a diferentes tipos de estrés	Koutaniemi <i>et al.</i> 2007
	spi 2	Aumento de las unidades coniferilaldehído en transformantes de sobreexpresión	Elfstrand <i>et al.</i> 2002
<i>P. alba</i>	CWPO-C	Colocalización con lignificación, capacidad de oxidar monolignoles y polímeros formados por los mismos	Aoyama <i>et al.</i> 2002 Sasaki <i>et al.</i> 2004, 2006
<i>P. sieboldii</i> x <i>P. gradidentata</i>	prxA3a	Colocalización con lignificación y reducción de las ligninas totales en transformantes con un iRNA específico	Li <i>et al.</i> 2003a
<i>P. trichocarpa</i>	PXP 3-4	Colocalización con lignificación y capacidad de oxidar siringaldazina	Christensen <i>et al.</i> 2001
<i>S. lycopersicum</i>	TPX1	Aumento de las ligninas totales en hojas de transformantes de sobreexpresión	El Mansouri <i>et al.</i> 1999
<i>Z. elegans</i>	ZePrx	Colocalización con lignificación y capacidad de oxidar monolignoles	Ros Barceló <i>et al.</i> 2000 Gabaldón <i>et al.</i> 2005
	ZPO-C	Colocalización con lignificación y capacidad de oxidar monolignoles	Sato <i>et al.</i> 2006



**Figura I.17. Siringil-peroxidasas. A. Motivos específicos de las peroxidasas de tipo S.**

Alineamiento de la región entre las histidinas distal y proximal de dos peroxidasas de tipo G (peroxidasa A2 de *A. thaliana* -X9952- y peroxidasa A2 de *Armoracia rusticana* G. Gaertn., B.Mey. & Scherb. -P80679-) y tres peroxidasas de tipo S (peroxidasa básica de *Asparagus officinalis* L. -AB042103-, peroxidasa básica de tipo S de *S. lycopersicum* -L13653- y peroxidasa básica de *Z. elegans* -AJ880395-). En amarillo se muestran los residuos altamente conservados en verde los parcialmente conservados y en rojo, los específicos de las peroxidasas de tipo S. **B. Estructura terciaria.** Estructuras de las peroxidasas A2 de *A. thaliana* (1) y ZePrx de *Z. elegans* (2). Esta última carece de la hélice D' y como consecuencia presenta una entrada al sitio catalítico mucho más abierto. Se numeran las hélices (amarillo) de la A a la J. En rojo se muestra el grupo hemo y en azul los grupos laterales de las histidinas distal y proximal. Figuras modificadas de Gómez-Ros *et al.* 2007a y Ros Barceló *et al.* 2007.

### 3.3.4. Estrategias para determinar la función de cada isoenzima

La función de una peroxidasa está limitada por los sustratos que es capaz de oxidar, por su patrón de expresión y su localización subcelular. Enzimas con secuencias codificantes muy parecidas pueden estar implicadas en funciones distintas al diferir en su patrón de expresión, mientras que otras que muestran más diferencia en su secuencia proteica pero que presentan promotores similares y, por lo tanto, patrones de expresión parecidos participan en el mismo proceso (Cosio & Dunand 2009). Aunque el gran número de genes de la familia ha posibilitado una cierta subfuncionalización, a menudo, diferentes isoenzimas son redundantes en su función. Por lo tanto, la tarea de relacionar una isoenzima específica de peroxidasa con su función no es sencilla (Hiraga *et al.* 2001). Para poder determinar la función de una peroxidasa concreta, a menudo, hay que combinar diferentes estrategias que permitan obtener la mayor cantidad de información sobre el papel que desarrolla la enzima *in planta*. Las estrategias que se han seguido para intentar establecer una relación isoenzima-función son las siguientes (Francoz *et al.* 2015):

1. Inhibición/inducción: empleo de inhibidores e inductores específicos (Ros Barceló *et al.* 2000). Esta estrategia normalmente permite establecer el tipo de enzima implicada en un proceso concreto.
2. Estudio de la actividad enzimática: consiste en estudiar qué sustratos puede o no oxidar la enzima y determinar la eficiencia con la que oxida cada uno (Gabaldón *et al.* 2005; Martínez-Cortés *et al.* 2012). Aunque la actividad *in vitro* de la enzima no tiene por qué coincidir con la función que desarrolla la enzima en la planta, sí que permite descartar funciones que no puede realizar.
3. Análisis transcriptómicos: perfil de expresión del gen (Lee *et al.* 2013). Este tipo de estudios no ofrecen pruebas definitivas de la implicación de una peroxidasa concreta en una función, pero permiten identificar candidatas en función de la coincidencia espacio-temporal de la enzima y el proceso a estudiar.
4. Análisis proteómicos: perfil de expresión de la proteína (Laugesen *et al.* 2007). Al igual que el caso anterior, esta forma de estudio solo permite identificar candidatas. No obstante, ofrece un soporte mayor que el estudio



transcriptómico ya que hay evidencias de la traducción de la proteína en el tejido de estudio o como respuesta al estímulo de interés.

5. Análisis *in silico*: consiste en emplear herramientas bioinformáticas para buscar enzimas que tengan las características que se buscan y, así, seleccionar candidatas que las cumplan (Dong *et al.* 2015; Herrero *et al.* 2013).
6. Sobreexpresión de la enzima: puede llevarse a cabo en la propia planta o de forma heteróloga (Jaggi *et al.* 2011; Passardi *et al.* 2006; Pedreira *et al.* 2011). Permite estudiar los efectos de la expresión de esta enzima sobre la fisiología de la planta. Debido a la alteración del patrón de expresión del gen, la información obtenida no se corresponde exactamente con la función *in planta*. Sin embargo, permite obtener información sobre isoenzimas de la planta en la que se lleva a cabo la sobreexpresión que puedan tener una función similar (Cosio & Dunand 2009).
7. Supresión de la expresión: consiste en anular la expresión de un gen y observar sus efectos. Puede llevarse a cabo mediante la alteración del gen de interés para impedir su expresión (Fernández-Pérez *et al.* 2014, 2015; Herrero *et al.* 2013; Passardi *et al.* 2006; Shigeto *et al.* 2015) o mediante el uso de iRNAs que anulen o reduzcan la cantidad de mRNA disponible para ser traducido (Blee *et al.* 2003; Jaggi *et al.* 2011; Lee *et al.* 2013; Passardi *et al.* 2006). Esta estrategia puede verse limitada por la redundancia de funciones que encontramos entre las isoenzimas de peroxidasas, ya que la acción de una enzima puede ser compensada por la actividad de otras similares. Este problema puede solventarse parcialmente suprimiendo de forma simultánea la expresión de varias peroxidasas con función redundante (Shigeto *et al.* 2015).

Dado que las diferentes estrategias ofrecen información distinta y complementaria, lo ideal es combinar varias para caracterizar lo mejor posible la función de la proteína (Herrero *et al.* 2013; Jaggi *et al.* 2011; Passardi *et al.* 2006).

#### **4. La implicación de la peroxidasa básica de *Zinnia elegans* Jacq. en la lignificación**

*Z. elegans* es una planta de ciclo anual de la familia *Asteraceae*. Se viene empleando como modelo para el estudio de la lignificación desde que, en 1980, Fukuda y Komamine establecieron cultivos celulares a partir de células de su mesófilo en los que tenía lugar la diferenciación de elementos traqueales. Este sistema *in vitro* ha permitido estudiar la diferenciación de este tipo celular y las fases en las que tiene lugar este proceso (Fukuda 1997), así como la expresión de genes durante el mismo (Demura *et al.* 2002).

Empleando este sistema, se observó que al inducir la formación de elementos traqueales también se inducía la expresión de una peroxidasa catiónica apoplástica (Church & Galston 1988; López-Serrano *et al.* 2004). Este mismo patrón de isoenzimas es el que se encuentra en el fluido intercelular de los hipocotilos de *Z. elegans* (López-Serrano *et al.* 2004) y su expresión está correlacionada temporalmente con la lignificación del tallo (Ros Barceló *et al.* 2002a). Además, el empleo de inhibidores para estudiar el comportamiento de esta isoenzima *in vitro* y las actividades siringaldazina y TMB-oxidasa asociadas a los haces vasculares en los hipocotilos de *Z. elegans* muestran un comportamiento semejante de ambas enzimas (Ros Barceló *et al.* 2000, 2002b). De esto se deduce que probablemente sea esta enzima la responsable de la lignificación del xilema de tallos e hipocotilos. También concuerda con que sean las peroxidasas las responsables de la polimerización oxidativa en estos tejidos el hecho de que el xilema de *Z. elegans* presente un sistema de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sustrato necesario para la acción de las peroxidasas. Este sistema consiste en una enzima de tipo NADPH oxidasa (Ros Barceló 1998) localizada en las membranas de las células del parénquima del xilema (Ros Barceló 2005).

El mismo patrón de isoenzimas que presentan los elementos traqueales, los hipocotilos y los tallos de *Z. elegans* es el que muestran también las suspensiones celulares de esta especie. En este sistema las enzimas extracelulares son secretadas al medio de cultivo; a partir del cual se purificaron dos isoenzimas de distinto peso molecular que diferían en el patrón de glucosilación. Se comprobó que esta enzima es capaz de oxidar los tres monolignoles con una afinidad por los mismos (K<sub>M</sub>) similar a

la de otras enzimas de la ruta de biosíntesis de los precursores de las ligninas; siendo el alcohol sinapílico el sustrato que oxida de forma más eficiente (Gabaldón *et al.* 2005). Además, es capaz de generar polímeros a partir de este alcohol ricos en enlaces  $\beta$ -O-4, lo que apoya su participación en la lignificación (Gabaldón *et al.* 2006).

A partir de las suspensiones celulares de *Z. elegans* se clonaron cuatro cDNA que codifican para el mismo polipéptido maduro, pero que se diferencian en algunos nucleótidos y en la región 5'-UTR (Gabaldón *et al.* 2005). Esto apunta a que esta peroxidasa podría estar codificada por varios genes, lo que concuerda con la naturaleza multigénica de las peroxidasas de clase III.

El análisis de las secuencias del cDNA y la proteína revelaron que ZePrx, la peroxidasa básica de *Z. elegans*, presenta todos los motivos típicos de una peroxidasa de clase III: sitios distal y proximal de unión a hemo, sitios de unión a calcio, 8 cisteínas implicadas en la formación de cuatro puentes disulfuro y un péptido señal para la secreción al medio extracelular. De las posibles secuencias de la proteína que podían ser objeto de modificaciones postraduccionales, solo los dos sitios de *N*-glucosilación sufren modificaciones en las proteínas maduras, existiendo hasta 10 posibles isoenzimas, 9 de ellas de igual peso molecular (Gabaldón *et al.* 2007).

La modelización tridimensional de la proteína madura mostró que ZePrx carece de la hélice D' presente en otras peroxidasas de clase III como la isoenzima A2 de *A. thaliana* (Fig. I.17B). Este cambio en la estructura secundaria de la proteína, típico de las siringil-peroxidasas, concuerda con su capacidad para oxidar eficientemente el alcohol sinapílico de forma directa. Por otra parte, el estudio de la distribución superficial de cargas y la disposición de los *N*-glucanos, la ausencia de motivos de interacción con las pectinas, así como la facilidad para recuperar esta enzima del fluido intercelular lleva a pensar que ZePrx no está unida a ningún polímero de pared, pudiendo moverse libremente por la misma (Gabaldón *et al.* 2007).

La expresión de *ZePrx* es inducida por hormonas que activan el crecimiento secundario en los hipocotilos de *Z. elegans* como las citoquininas NAA y BAP (Gutiérrez *et al.* 2009) e inhibida por ácido giberélico, hormona que ralentiza el desarrollo vascular de los hipocotilos (López Núñez-Flores *et al.* 2010). Esto concuerda con la presencia de elementos de respuesta a estas enzimas en el promotor de *ZePrx*. Este, además, presenta secuencias reconocidas por factores transcripcionales de tipo MYB y

NAC, como los elementos AC, frecuentes en los promotores de genes implicados en la biosíntesis de ligninas (Gutiérrez *et al.* 2009). Este promotor también contiene secuencias de respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y óxido nítrico. Ambos compuestos modulan la expresión génica de *ZePrx*, el primero induciéndola y el segundo inhibiéndola. Asimismo, el óxido nítrico es capaz de inhibir la actividad de la enzima formando un aducto o causando modificaciones postraduccionales en la misma (Gómez-Ros *et al.* 2012). En definitiva, la actividad de *ZePrx* está sometida a varios niveles de control estricto que apoyan su participación en la lignificación.

La presencia de enzimas similares a *ZePrx*, con capacidad de oxidar el alcohol sinapílico o su análogo la siringaldazina y un pI similar, se ha comprobado para otros miembros de la familia *Asteraceae* (Ros Barceló & Aznar-Asensio 2002), otras angiospermas (Gómez-Ros *et al.* 2007a), gimnospermas y algunas especies basales (Gómez-Ros *et al.* 2007b; Martínez-Cortés *et al.* 2012; Novo-Uzal *et al.* 2014). Estos datos apuntan a que la presencia de una peroxidasa de estas características es un hecho conservado a lo largo de la evolución. Además, se ha comprobado mediante mutantes con inserciones de T-DNA que enzimas homólogas de *ZePrx* en *A. thaliana* están implicadas en lignificación (Fernández-Pérez *et al.* 2014, 2015; Herrero *et al.* 2013).

Por lo tanto, la peroxidasa básica de *Z. elegans*, *ZePrx*, cumple con los supuestos que ha de cumplir una enzima para considerarla implicada en lignificación: (i) muestra especificidad de sustrato por los monolignoles, (ii) está presente en la pared celular, (iii) se conoce su estructura primaria, (iv) tiene una correlación temporal con la lignificación activa, (v) presenta homólogos ampliamente distribuidos en las especies de plantas vasculares y (iv) es capaz de oxidar los alcoholes cinamílicos a compuestos similares a las ligninas.

No obstante, hasta el momento no se han obtenido evidencias causales de la participación de esta peroxidasa en la polimerización de las ligninas. Esto se debe a que no se han descrito mutantes que afecten a la expresión de esta enzima y a que *Z. elegans* es una especie recalcitrante a la transformación, lo que ha impedido la obtención de mutantes mediante inserciones de T-DNA o transformarla con un iRNA. La alternativa a estas opciones consiste en la sobreexpresión heteróloga del gen que la codifica en una especie modelo (Elfstrand *et al.* 2002). Con el fin de continuar la línea de trabajo sobre el papel de *ZePrx* en la biosíntesis de las ligninas (Fernández-Pérez *et al.* 2014, 2015;

Gabaldón *et al.* 2005, 2006, 2007; Gómez-Ros *et al.* 2007a, 2007b, 2012; Gutiérrez *et al.* 2009; Herrero *et al.* 2013; López Núñez-Flores *et al.* 2010; López-Serrano *et al.* 2004; Ros Barceló 1998, 2005; Ros Barceló & Aznar-Asensio 2002; Ros Barceló *et al.* 2000, 2002a, 2002b), en este trabajo utilizaremos esta estrategia para confirmar la participación de la enzima ZePrx en la lignificación sobreexpresando el gen que la codifica en *N. tabacum*. Además, comprobaremos el efecto que la sobreexpresión de esta enzima provoca sobre el ciclo del ascorbato-glutatión y su impacto sobre el perfil de expresión génica, para caracterizar en mayor detalle la función *in vivo* de esta peroxidasa.



## ***II. OBJETIVOS***

---





Para conocer mejor el papel que desempeña ZePrx en la lignificación, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Sobreexpresar el gen de la peroxidasa básica de *Zinnia elegans* Jacq. (*ZePrx*) en plantas de la especie modelo *Nicotiana tabacum* L.
- 2) Caracterizar fenotípicamente los transformantes de sobreexpresión mediante el estudio de su crecimiento y desarrollo, estructura y organización vascular, composición de la pared celular de los tallos, así como a través del análisis cuantitativo y cualitativo de las ligninas.
- 3) Caracterizar el efecto de la sobreexpresión de *ZePrx* sobre los sistemas antioxidantes mediante el estudio de los cambios en el ciclo del ascorbato-glutatiión.
- 4) Estudiar los cambios en el transcriptoma en las plantas transformadas para sobreexpresar *ZePrx*.



### ***III. MATERIAL Y MÉTODOS***

---



#### 1. Obtención de vectores para la transformación de *Nicotiana tabacum* L.

##### 1.1. Material vegetal

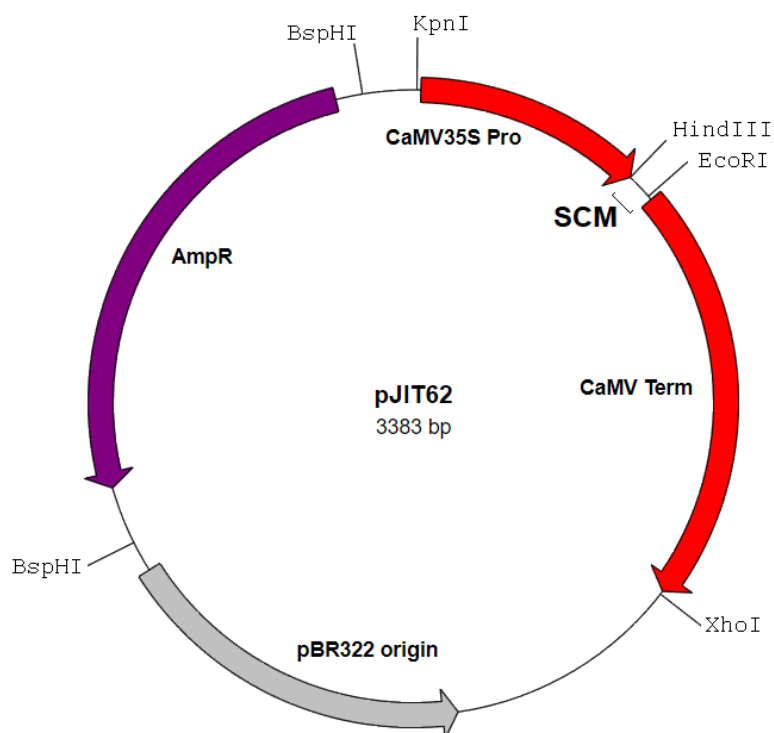
Se hicieron germinar semillas de *Z. elegans* cv. Envy sobre papel de filtro estéril humedecido con agua estéril en placas Petri de 14 cm de diámetro. Las plántulas se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h de luz (25 °C) y 8 h de oscuridad (18 °C). Seis días después de la germinación se recogieron los hipocotilos de las plántulas y se congelaron en nitrógeno líquido.

##### 1.2. Extracción de RNA y obtención de cDNA del gen *ZePrx*

Se extrajo el RNA de los hipocotilos de *Z. elegans* utilizando el kit de extracción Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el RNA y se verificó su calidad usando un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). A continuación, se obtuvo el cDNA empleando el iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se partió de 200 ng de RNA como molde y se empleó el cebador Oligo(dT)<sub>20</sub> para convertir a cDNA únicamente las moléculas de mRNA que presentasen una cola poliadenilada. Se diseñaron cebadores específicos para amplificar la secuencia de cDNA de *ZePrx* (AJ880395.1) empleando la opción de diseño manual del Clone Manager Professional (Edition 9). En el extremo 5' de cada cebador se incluyó la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción (*HindIII* y *EcoRI*) con un sitio de corte en el sitio de clonaje múltiple (SCM) del vector pJIT62 (Fig. III.1). Finalmente, se añadieron en los extremos 5' de ambos cebadores la secuencia GAGA para facilitar el corte de las enzimas de restricción. Los cebadores resultantes (*ZePrxCLOF* y *ZePrxCLOF*) se muestran en la tabla III.1.

La secuencia de *ZePrx* se amplificó por PCR empleando 4 ng de cDNA molde, los cebadores específicos *ZePrxCLOF* y *ZePrxCLOF*, a una concentración de 0,4 µM cada uno, dNTPs 0,2 mM, *Pfu* Buffer con MgSO<sub>4</sub> y 1,25 U de *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Scientific). Esta mezcla se incubó empleando el programa *ZePrxCLO* (Tabla III.2). A continuación, el producto de PCR se purificó empleando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up de Macherey-Nagel siguiendo las instrucciones del fabricante. El

producto de PCR purificado se cuantificó y se comprobó su calidad empleando un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.



**Figura III.1. Mapa del plásmido pJIT62.** Se señala el origen de replicación (pBR322 origin), el gen de resistencia a ampicilina (AmpR), el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S Pro), el terminador del virus del mosaico de la coliflor (CaMV Term) y el sitio de clonaje múltiple (SCM). Se señalan los lugares de corte de las enzimas de restricción empleadas durante la construcción de los vectores: *KpnI*, *HindIII*, *EcoRI*, *XhoI* y *BspHI*.

### 1.3. Obtención de células competentes de *Escherichia coli*

Para obtener células químicamente competentes de *Escherichia coli* de la cepa DH5 $\alpha$  se cultivaron células de esta cepa en medio LB durante toda la noche a 37 °C y en agitación a 200 rpm. La suspensión de células resultante se diluyó en medio LB en proporción 1:200 y se incubó de nuevo hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) entre 0,45 y 0,55. Este cultivo se diluyó en medio LB (1:200) y se dejó crecer en las mismas condiciones durante toda la noche. Para parar el crecimiento del cultivo, las células se enfriaron en hielo durante 15 min. A continuación, se recuperaron las células mediante una centrifugación (4 °C, 855 g, 7 min) y se resuspendieron en 20 mL de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M a 4 °C. Tras una incubación de 15 min en hielo, se centrifugaron

de nuevo las células en las mismas condiciones y se resuspendieron en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío. Tras 1 h de incubación en hielo, se prepararon alícuotas para su almacenaje añadiendo glicerol estéril hasta una concentración final del 15% (v/v). Las alícuotas de células se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

#### 1.4. *Obtención del vector de entrada pJIT62*

Como vector de entrada se empleó el vector pJIT62 (Hellens *et al.* 2000a, 2000b) (Fig. III.1). Este vector y el producto de PCR de *ZePrx* se digirieron en sendas reacciones con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* (Roche) simultáneamente en el tampón B SuRE/Cut (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción tuvo lugar a 37 °C durante 12 h y se inactivaron las enzimas incubando 20 min a 80 °C. Los productos de la digestión se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% y las bandas de interés se cortaron del gel y el DNA se purificó y cuantificó como se indica en el apartado 1.2.

Los fragmentos de digestión purificados se emplearon para la ligación el mismo día de la digestión. En la ligación se emplearon 100 ng de vector, 28 ng del producto de PCR (ratio molar 1:1), T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Fisher Scientific), 1 U de T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific). Esta mezcla se incubó 1 h a 22 °C y 10 min a 65 °C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de ligación obtenidos se conservaron a -20 °C hasta su uso.

##### 1.4.1. Transformación de las células de *E. coli*

Tras la ligación, los productos de la misma se emplearon para transformar mediante choque térmico 100 µL de células competentes de *E. coli* de la cepa D5Hα. Las células competentes se descongelaron en hielo y se les añadieron 15 µL de la reacción de ligación. Tras incubar 30 min en hielo, la mezcla se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 1 min y 40 s, tras el que se enfriaron las células en hielo durante 5 min. Para favorecer la recuperación de las células, se añadieron 600 µL de medio LB y se incubaron 2 h a 37 °C en agitación a 250 rpm. A continuación, se concentró el cultivo, centrifugándolo (10 min a 16000 *g*), retirando 400 µL de sobrenadante y resuspendiendo las células. Se sembraron 10 µL de esta suspensión en placas de medio LB con carbenicilina 100 mg L<sup>-1</sup> (p/v). Estas placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche para obtener colonias resistentes al antibiótico.

#### 1.4.2. Cribado de las colonias

Las colonias que crecieron en presencia de antibiótico se testaron por PCR empleando cebadores específicos del gen *ZePrx* (*ZePrxCLOF* y *ZePrxCLOR* –Tabla III.1–). La mezcla de reacción utilizada contenía DreamTaq Buffer (Thermo Scientific), dNTPs 0,2 mM, *ZePrxCLOF* 0,8 µM, *ZePrxCLOR* 0,8 µM y 0,75 U de DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific). A la mezcla de PCR se añadió directamente parte de la colonia a testar y se incubó siguiendo el programa *ZePrxEXT* (Tabla III.2).

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se verificó la presencia de una banda del tamaño esperado (978 pb).

**Tabla III.1. Parejas de cebadores empleadas en la clonación.** Subrayadas se indican las secuencias de restricción añadidas para usar durante la obtención de los vectores de clonación. ER: enzima de restricción.

Nombre	Secuencia	ER
<i>ZePrxCLOF</i>	GAGAAAGCTTATGAGTTATCATAAGTCAAGTGG	<i>HindIII</i>
<i>ZePrxCLOR</i>	GAGAGAATTCTTAACTGGGATTACCGCAAAGAG	<i>EcoRI</i>
<i>ZePrxSEC5</i>	TGTGGTATCGTAAAAGGTGG	-
<i>ZePrxSEC3</i>	ATGTCAACAATCCTGCAACG	-
<b>B5</b>	GGTAACGCCAGGGTTTTCCAGT	-
<b>B3</b>	CCCGGGCTGCAGGAATTCGAT	-
<i>ZePrxF</i>	TCTTCCAAGAGGGAACATGG	-
<i>ZePrxR</i>	CCGAGTGTGTGAGATCCTGA	-
<b>NtBTub1F</b>	GAAGGAATGGACGAGATGGA	-
<b>NtBTub1R</b>	TTCACCTTCGTCATCAGCAG	-

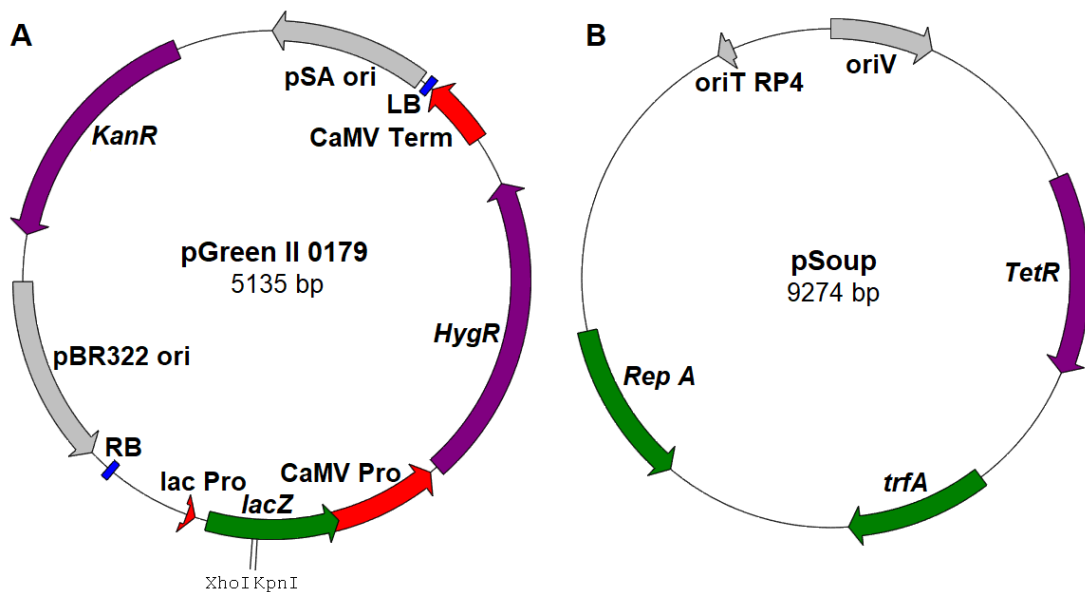
#### 1.4.3. Obtención del vector

Las colonias positivas se emplearon para iniciar un cultivo líquido en 10 mL de medio LB con carbenicilina 100 mg L<sup>-1</sup>. Estos cultivos se dejaron crecer a 37 °C en agitación un mínimo de 12 h. Pasado este tiempo se emplearon para obtener stocks del cultivo añadiendo glicerol estéril hasta una concentración 15% (v/v), que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Por otro lado, el resto del cultivo se utilizó para purificar el vector pJIT62 con el gen *ZePrx* insertado: pJIT62(*ZePrx*). Para ello se empleó el kit WideUse™ Plasmid Purification Kit (Canvax) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración del vector usando un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.



1.5. Obtención de plásmidos pGreen II 0179

En primer lugar, se llevó a cabo la digestión de los vectores pGreen II 0179 (Fig. III.2A) (Hellens *et al.* 2000a, 2000b) y pJIT62(ZePrx). El plásmido pGreen II 0179 se digirió en tampón R (Fermentas) empleando 10 U de *XhoI* (Fermentas). Por otro lado, el plásmido pJIT62(ZePrx) se digirió en tampón 0 (Fermentas) con 15 U de *XhoI* y 10 U de *BspHI* (Fermentas). Ambas mezclas de reacción se incubaron en paralelo 14 h a 37 °C y 20 min a 80 °C. A continuación el resultado de las digestiones se purificó y cuantificó como en el apartado 1.2.



**Figura III.2. Mapas de los plásmidos pGreen II 0179 (A) y pSoup (B).** A: Se señala el origen de replicación en *E. coli* (pBR322 ori) y en *A. tumefaciens* (pSA ori), los genes de resistencia a kanamicina (*KanR*) e higromicina (*HygR*), el promotor (CaMV Pro) y terminador (CaMV Term) del virus del mosaico de la coliflor que controlan el gen de resistencia a la higromicina, los extremos izquierdo (LB) y derecho (RB) del T-DNA, el promotor del operón lac (lac promoter) y el gen que codifica la enzima β-galactosidasa (*lacZ*). En este último se localiza el sitio de clonaje múltiple del que solo se señala la posición de los sitios de corte de las enzimas *KpnI* y *XhoI*. B: Se señala el origen de replicación en *E. coli* (oriT RP4) y en *A. tumefaciens* (OriV), el gen de resistencia a tetraciclina (*TetR*) y los dos genes necesarios para la replicación de pGreen II 0179 en *A. tumefaciens* (*RepA* y *trfA*).

Los plásmidos purificados tras la digestión se sometieron a una segunda digestión con la enzima *KpnI*. Para ello, se emplearon 10 U de *KpnI* (Fermentas) para cada reacción, que se incubó durante 5 h a 37 °C y se inactivó subiendo la temperatura

a 80 °C durante 20 min. Los fragmentos de interés se separaron, purificaron y cuantificaron como se indica en el apartado 1.4.

Los fragmentos purificados tras la digestión de los plásmidos se emplearon para la ligación el mismo día de la digestión como se indica en el apartado 1.4. En este caso se emplearon 50 ng de vector pGreen II 0179 y 62 ng del cassette del vector pJIT62(*ZePrx*) (ratio molar 3:1 –inserto:vector–). Los productos de ligación obtenidos se conservaron a -20 °C hasta su uso.

#### 1.5.1. Transformación de células de *E. coli*

Tras la ligación se llevó a cabo la transformación como se describe en el apartado 1.4.1., empleando células competentes de *E. coli* de la cepa XL1 blue. Estas se obtuvieron siguiendo el método descrito en el apartado 1.3 para la cepa DH5 $\alpha$ . Una vez transformadas las células, se sembraron 50  $\mu$ L de la suspensión resultante en placas de medio LB con kanamicina 50 mg L<sup>-1</sup>, X-Gal 0,2 mg mL<sup>-1</sup> e IPTG 1 mM. Estas placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche para obtener colonias resistentes al antibiótico.

**Tabla III.2. Programas de PCR.** Se indica la duración y temperatura de cada una de las etapas de los programas de PCR.

Nombre	Desnaturalización inicial	Ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final
<b>ZePrxCLO</b>	95 °C 3 min	30	95 °C 30 s	52 °C 30 s	72 °C 3 min	72 °C 10 min
<b>ZePrxEXT</b>	95 °C 5 min	35	95 °C 30 s	52 °C 30 s	72 °C 2 min	72 °C 10 min
<b>ZePrxEXT2</b>	95 °C 5 min	35	95 °C 30 s	52 °C 30 s	72 °C 3 min	72 °C 10 min
<b>NicZeSCR</b>	95 °C 3 min	35	95 °C 45 s	53 °C 45 s	72 °C 2 min	72 °C 10 min
<b>NtEXPZeP</b>	95 °C 3 min	35	95 °C 30 s	53 °C 30 s	72 °C 1 min	72 °C 10 min

#### 1.5.2. Cribado de las colonias

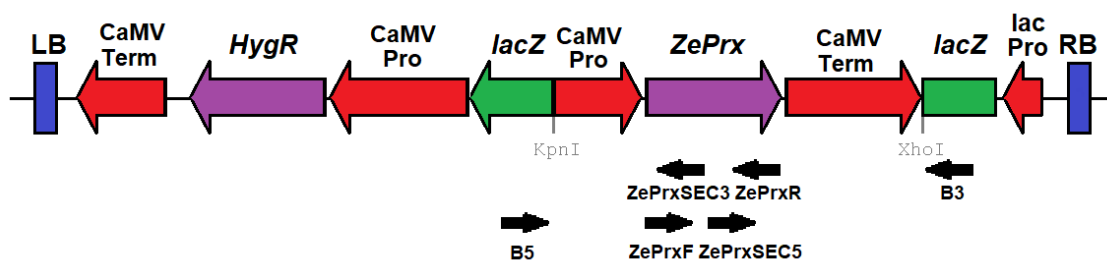
Las colonias transformadas con el vector pJIT62(*ZePrx*) (resistentes a antibiótico y de color blanco) se testaron por PCR como en el apartado 1.4.2 usando cebadores específicos del vector pGreen II 0179 (B3 y B5 –Tabla III.1-) y el programa de PCR ZePrxEXT (Tabla III.2). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se verificó la presencia de una banda del tamaño esperado (2246 pb).

1.5.3. Obtención del vector

Las colonias positivas se emplearon para iniciar un cultivo líquido en 10 mL de medio LB con kanamicina 50 mg L<sup>-1</sup> y se procedió como en el apartado 1.4.3 para la multiplicación y purificación del vector pGreen II 0179 con la inserción de *ZePrx*: pGreen II 0179(*ZePrx*).

1.5.4. Secuenciación

Una vez obtenido el vector pGreen II 0179(*ZePrx*), este se secuenció para comprobar que no había mutaciones ni en el vector ni en la secuencia del gen. Para la secuenciación se emplearon 6 cebadores diferentes: B5, *ZePrxCLOF*, *ZePrxSEC5*, *ZePrxSEC3*, *ZePrxCLOR* y B3 (Tabla III.1). El lugar de unión de cada cebador se indica en la Fig. III.3. La secuenciación se llevó a cabo mediante el método de Sanger para lo que se empleó un analizador genético 3130xl (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidade da Coruña. Cada reacción de secuenciación se llevó a cabo por duplicado.



**Figura III.3. Esquema del T-DNA del plásmido pGreen II 0179(*ZePrx*).** Se muestran los lugares de hibridación de los diferentes cebadores utilizados para la secuenciación del *cassette* insertado procedente de pJIT62(*ZePrx*), limitado por los sitios de corte de las enzimas *KpnI* y *XhoI*.

**2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens***

Se obtuvieron células competentes para la transformación química de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa AGL1 mediante el método de congelación y descongelación de Wise et al. (2006). Estas células se transformaron simultáneamente con el plásmido pGreen II 0179 (vacío o con inserto) y el plásmido pSoup (Hellens et al. 2000b) (Fig. III.2).

Se añadieron 800 ng de cada plásmido a las células competentes y se incubaron 5 min en hielo. Se congelaron en nitrógeno líquido durante 5 min y, a continuación, se incubaron a 37 °C durante 5 min. Se añadieron 300 µL de medio YT (extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, triptona 8 g L<sup>-1</sup>, NaCl 2,5 g L<sup>-1</sup>, pH 7,0) para recuperar las células y se mantuvieron a 28 °C en agitación durante 2 h. Tras este paso, se concentraron las células por centrifugación (2 min a 2700 g), retirando 300 µL de sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el volumen restante, que se sembró en su totalidad en placas con medio YEP (peptona 10 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g L<sup>-1</sup> y agar 15 g L<sup>-1</sup>, pH 7,0) con antibióticos (tetraciclina 7,5 µg mL<sup>-1</sup>, kanamicina 50 µg mL<sup>-1</sup> y rifampicina 25 µg mL<sup>-1</sup>). Los antibióticos se emplearon para seleccionar bacterias que hubiesen incorporado el plásmido pSoup, el pGreen II 0179 y que fuesen de la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*, respectivamente. Las placas se incubaron a 28 °C durante dos días.

Las colonias que crecieron en presencia de antibiótico se testaron por PCR como se indica en el apartado 1.5.2. y se verificó la presencia de una banda correspondiente a la longitud del gen del fragmento de vector comprendido entre B3 y B5: 2246 pb en el caso del vector pGreen II 0179(*ZePrx*), y 147 pb en el del vector vacío.

### **3. Obtención de plantas transformantes**

#### *3.1. Obtención de material vegetal*

Semillas de *N. tabacum* cv. Petit Havana (SR1) se esterilizaron mediante un lavado en lejía al 5% durante 10 min y sucesivos lavados de agua estéril. Las semillas desinfectadas se sembraron en medio MS (Murashige & Skoog 1962) 0,5X con sacarosa 10 g L<sup>-1</sup> y agar 8 g L<sup>-1</sup> en botes de cultivo *in vitro*. Se mantuvieron en una cámara de cultivo con un régimen de iluminación de 16 h de luz (25 °C) y 8 h de oscuridad (18 °C).

#### *3.2. Transformación de N. tabacum*

Para la transformación de *N. tabacum* se emplearon plantas de aproximadamente un mes. La transformación se llevó a cabo como se describe en Clemente (2006) manteniendo los explantos y las plantas en proceso de regeneración en las condiciones indicadas en el apartado 3.1.

3.2.1. Precultivo

Se cortaron las hojas de las plantas germinadas *in vitro* en condiciones de esterilidad en fragmentos de unos 5 mm de diámetro que se depositaron en un medio de precultivo (Tabla III.3) durante 36 h (Fig. III.4A).

3.2.2. Co-cultivo

A partir de las colonias positivas de *A. tumefaciens* obtenidas en el apartado 2, se inoculó un cultivo líquido en 2 mL de medio YEP con tetraciclina 7,5 µg mL<sup>-1</sup>, kanamicina 50 µg mL<sup>-1</sup> y rifampicina 25 µg mL<sup>-1</sup>, que se mantuvo a 28 °C y en agitación constante. Una vez se saturó este precultivo, se pasó a 50 mL de medio YEP con los mismos antibióticos y se cultivaron durante 8 h a 28 °C en agitación. Las células se centrifugaron a 3000 *g* y se resuspendieron en el medio de co-cultivo líquido (Tabla III.3) hasta una OD<sub>660</sub> de entre 0,5 y 1,0. Estos inóculos se pasaron a placas Petri a las que también se transfirieron los fragmentos de hoja precultivados y se co-incubaron durante 30 min. A continuación, los fragmentos de hoja se secaron con papel de filtro estéril y se pasaron a placas con medio de co-cultivo sólido (Tabla III.3) durante cuatro días.

3.2.3. Selección

Los fragmentos de hoja se pasaron a medio de selección (Tabla III.3), en el que estuvieron durante un mínimo de cuatro semanas, para inducir la formación de callo a partir del tejido infectado por *A. tumefaciens* con inserción de T-DNA (Fig. III.4B).

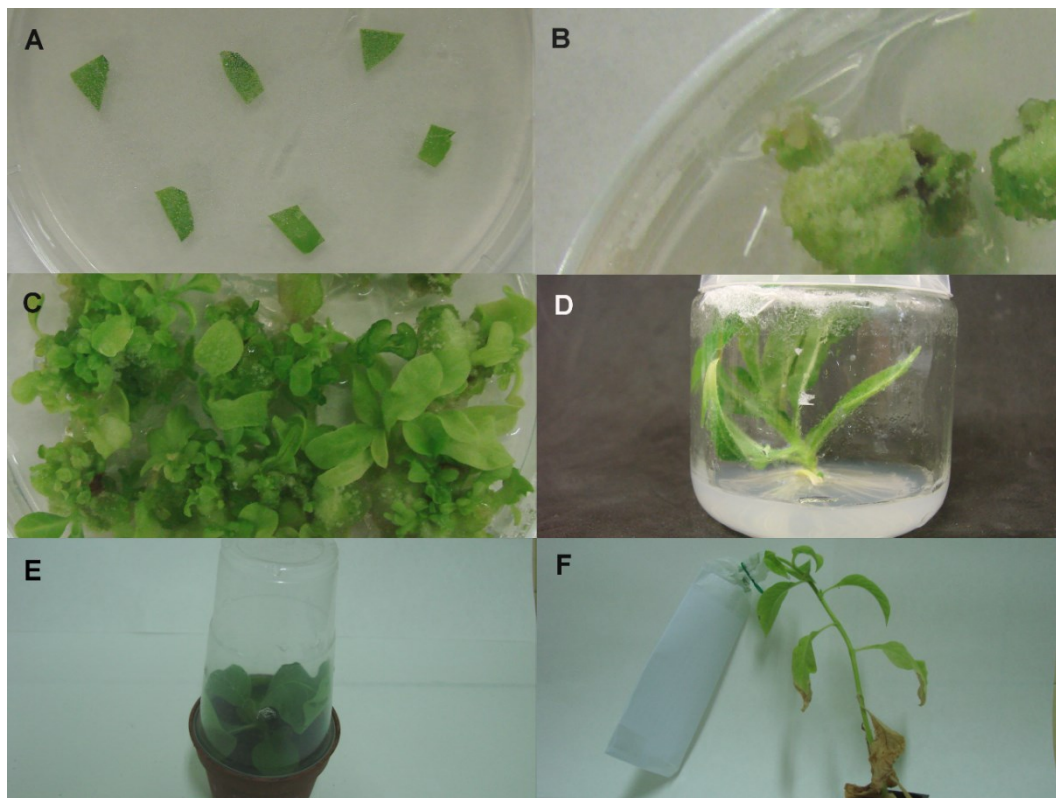
Tabla III.3. Composición de los medios empleados en la transformación de *N. tabacum*.

	Precultivo	Co-cultivo	Selección	Enraizamiento	Selección de plántulas
<b>Sales MS</b>	1X	0,1X	1X	0,5X	0,5X
<b>Vitaminas Gamborg</b>	1X	1X	1X	1X	0,5X
<b>Sacarosa</b>	30 g L <sup>-1</sup>	30 g L <sup>-1</sup>	30 g L <sup>-1</sup>	10 g L <sup>-1</sup>	10 g L <sup>-1</sup>
<b>NAA</b>	0,1 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>	-
<b>BAP</b>	1 mg L <sup>-1</sup>	1 mg L <sup>-1</sup>	1 mg L <sup>-1</sup>	-	-
<b>Agar</b>	8 g L <sup>-1</sup>	8 g L <sup>-1</sup>	8 g L <sup>-1</sup>	8 g L <sup>-1</sup>	8 g L <sup>-1</sup>
<b>Higromicina</b>	-	-	50 µg mL <sup>-1</sup>	-	50 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Cefotaxima</b>	-	-	200 µg mL <sup>-1</sup>	-	-
<b>Acetosiringona</b>	-	100 µM	-	-	-
<b>MES</b>	-	3,7 g L <sup>-1</sup>	-	-	-

### 3.2.4. Enraizamiento

Una vez que a partir de los callos seleccionados se empezaron a diferenciar tallos, se pasó a medio de enraizamiento un único tallo de cada callo (Tabla III.3) para regenerar plantas completas (Fig. III.4C).

Cuando las plantas contaron con raíz desarrollada (Fig. III.4D), estas se pasaron a cultivar en tierra. Se mantuvieron en sustrato TOPF (mezcla de turbas en diferentes grados de descomposición y fertilizante NPK, Plantaflor) regándolas con agua del grifo para mantener un estado de hidratación óptimo. Durante la primera semana se mantuvieron cubiertas con un vaso de plástico transparente y durante la segunda semana se fueron abriendo agujeros para aclimatar a las plantas paulatinamente a un ambiente más seco (Fig. III.4E).



**Figura III.4. Etapas de la transformación y regeneración de *N. tabacum*.** A. Fragmentos de hoja empleados en la transformación con *A. tumefaciens*. B. Callos formados por dediferenciación de las células transformadas de los discos foliares. C. Regeneración de tallos a partir de callo. D. Planta enraizada *in vitro*. E. Planta en proceso de aclimatación al cultivo en tierra. F. Planta encapuchada para evitar el cruce de líneas.

#### 4. Selección de líneas transformantes

##### 4.1. Obtención de líneas transformantes homocigotas

Las plantas obtenidas por regeneración tras la transformación con *A. tumefaciens* constituyen la primera generación (T1) de las líneas a obtener. Estas plantas se mantuvieron en cámara de cultivo hasta su floración. Cuando formaron capullos estos se cubrieron para impedir la polinización cruzada de las líneas (Fig. III.4F) y obtener semillas resultado de la autofecundación (T2).

##### 4.1.1. Selección de líneas con una sola inserción

Se identificaron las líneas con una sola inserción mediante un análisis de segregación. Se esterilizaron las semillas como se indica en el apartado 3.1. A continuación se sembraron en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio de selección (Tabla III.3). Se dejaron crecer en una cámara de cultivo en las condiciones indicadas en el apartado 3.1 durante tres semanas. Pasado este tiempo se llevó a cabo el recuento de las plántulas resistentes y sensibles al antibiótico en cada placa y se seleccionaron las líneas con un ratio 3:1 (resistentes:sensibles).

##### 4.1.2. Selección de líneas homocigotas

Las líneas seleccionadas se sembraron en tierra y se mantuvieron en las mismas condiciones que la T1 hasta obtener semillas. Las plantas de la T2 se sometieron a un cribado por PCR directa para eliminar las plantas homocigotas sin inserción.

Se empleó el método de extracción de DNA en un paso (Kasajima *et al.* 2004). Se tomó 1 µL de la solución resultante para llevar a cabo una PCR: tampón NZYTaQ (NZYTech), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 0,2 mM, PF 0,8 µM, PR 0,8 µM y 0,75 U de NZYTaQ DNA polymerase (NZYTech). En las líneas de vector vacío se emplearon los cebadores B3 y B5, mientras que para las líneas de sobreexpresión se emplearon los cebadores ZePrxCLOF y ZePrxCLOR (Tabla III.1). Las condiciones de la PCR fueron las del programa NicZeSCR (Tabla III.2).

Se obtuvieron las semillas (T3) de las plantas que resultaron positivas por PCR, de la misma forma que con la T1 y, se realizó un análisis de segregación igual que en el caso de la T2. En cambio, en este caso se seleccionaron aquellas líneas que presentaron un 100% de plantas resistentes al antibiótico. De cada línea de la T1 solo se escogieron las semillas de una planta de la T3.

#### 4.2. *Determinación de los niveles de expresión de ZePrx*

Las líneas seleccionadas tras el segundo análisis de segregación se sembraron en tierra estéril (mezcla de turbas con fertilizante NPK) y se mantuvieron en una cámara de cultivo en condiciones controladas de 16 h de luz (25 °C) y 8 h en oscuridad (18 °C) con una intensidad de luz de 150  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Se recogieron muestras de tallo de plantas adultas sin florecer seis semanas después de la siembra. Todas las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Se obtuvieron tres réplicas biológicas para cada línea.

La extracción de RNA y la síntesis de cDNA se llevaron a cabo como se indica en el apartado 1.2.

A partir del cDNA de cada línea se prepararon tres diluciones (1/2, 1/10 y 1/20) en agua ultrapura estéril. Las tres diluciones se emplearon como molde en sendas reacciones de PCR. La mezcla de reacción empleada (24  $\mu\text{L}$ ) constó de tampón de reacción NZYTaQ (NZYTech),  $\text{MgCl}_2$  2 mM, dNTPs 0,2 mM, cebador *forward* 0,8  $\mu\text{M}$ , cebador *reverse* 0,8  $\mu\text{M}$  y 0,75 U de NZYTaQ DNA Polymerase (NZYTech). A esta se le añadió 1  $\mu\text{L}$  de la dilución de cDNA correspondiente y se incubó con el programa de PCR NtEXPZeP (Tabla III.2). Se emplearon cebadores específicos para amplificar la secuencia del gen *ZePrx* (AJ880395.1) (*ZePrxF* y *ZePrxR*) y el gen  $\beta$ -Tubulina 1 (U91564.2) (*NtBTub1F* y *NtBTub1R*) (Tabla III.1), que se empleó como gen de referencia (Schmidt & Delaney 2010). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% en el que se usó como marcador de peso molecular el Ladder VI (NZYTech) y GreenSafe 0,01% (v/v) (NZYTech) como agente intercalante. Para revelar los geles se empleó un documentador de geles Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ (Bio-Rad).

#### 4.3. *Detección de ZePrx en muestras proteicas*

##### 4.3.1. Extracción de proteínas

Se sembraron plantas de las líneas seleccionadas en las condiciones descritas en el apartado 4.2. Pasadas 6 y 8 semanas se recogieron los tallos y se procesaron en fresco. Para cada una de las líneas y tiempos se obtuvieron tres réplicas biológicas.

Los tallos se cortaron al nivel del primer par de hojas verdaderas, se deshojaron, se pesaron y se cortaron transversalmente en fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de longitud empleando un bisturí. Los fragmentos obtenidos se lavaron con agua



destilada y se infiltraron a vacío durante 15-25 min en 45 mL de tampón frío Tris-acetato 50 mM KCl 1 M pH 5,0. Se recuperaron los fragmentos del tallo por filtración y se recuperó el fluido apoplástico mediante a centrifugación en tubo Falcon con una jeringa (10 min a 500 *g* a 4 °C).

Los fragmentos de tallo se recuperaron tras la centrifugación y se homogeneizaron en mortero con un tampón Tris-HCl 50 mM, KCl 1M, EDTA 1 mM pH 7,5 en hielo. El homogeneizado se centrifugó 40 min a 15800 *g* a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, que se consideró el fluido simplástico.

Tanto el fluido apoplástico como el simplástico se dializaron toda la noche en membranas de celulosa con tamaño de poro de 14 kDa (Sigma) frente a tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0 y Tris-HCl 50 mM pH 7,5, respectivamente. Las muestras dializadas se conservaron a -20 °C.

El precipitado de la última centrifugación se recogió y se conservó a -20 °C para emplearlo en la obtención de paredes celulares.

#### 4.3.2. Determinación del contenido en proteínas

Se mezclaron 50 µL de extracto proteico con 450 µL de agua destilada y 500 µL de reactivo Quick Start Bradford (Bio-Rad) y se incubaron en oscuridad durante 30 min. Se determinó la absorbancia de las muestras ( $\lambda = 595$  nm) frente a un blanco preparado de igual manera que las muestras, pero sustituyendo estas por el tampón usado para la extracción. Cada muestra se preparó por triplicado.

Los valores de absorbancia se emplearon para determinar la concentración proteica por interpolación en una recta patrón elaborada con seroalbúmina bovina.

#### 4.3.3. Electroforesis disociante (SDS-PAGE)

Se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Laemmli (1970) con algunas modificaciones.

##### *Preparación de geles*

Se prepararon geles de 1 mm de grosor. El gel separador se preparó empleando un tampón Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 y acrilamida/bisacrilamida 29/1 (Bio-Rad) al 10%. Para el gel concentrador se usó un tampón Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 y la concentración final de acrilamida/bisacrilamida fue del 4%. En ambos geles se añadió

SDS al 0,1% y se emplearon persulfato amónico y TEMED para inducir la polimerización. La mezcla de reactivos se desgasificó durante 5 min empleando una bomba de vacío antes de añadir estos dos últimos compuestos.

#### *Preparación de las muestras y desarrollo de la electroforesis*

Se empleó la misma cantidad total de proteínas para todas las muestras y se les añadieron 10 µL de tampón de carga (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol 8% (v/v), SDS 0,7% (p/v) y azul de bromofenol 0,01% (p/v)). Las muestras se desnaturalizaron en un baño de agua en ebullición durante 10 min.

Para la migración se empleó un tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3 con SDS 0,1% y se llevó a cabo en un sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad) aplicando un voltaje de 120 V mediante una fuente de alimentación Bio-Rad Power-Pac 1000. Como marcador de peso molecular se empleó el PageRuler Unstained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific).

#### *Tinción de los geles con nitrato de plata*

Los geles se tiñeron siguiendo el método del nitrato de plata (Oakley *et al.* 1980) empleando el kit PlusOne Silver Staining Kit (Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los geles se lavaron y se preservaron a 4 °C en agua destilada.

#### 4.3.4. Isoelectroenfoque (IEF)

##### *Preparación de los geles*

Se prepararon geles de 1 mm de grosor siguiendo el procedimiento descrito por Wrigley (1971) con algunas modificaciones. La composición de los geles fue acrilamida/bisacrilamida (29:1) 6,5% (p/v), anfolinas pH 3,5 – 10 BioLyte (Bio-Rad) 2% (p/v), glicerol 5% (v/v) y persulfato amónico 0,06% (p/v).

##### *Desarrollo de la electroforesis*

La electroforesis se desarrolló empleando un sistema Multiphor II (Pharmacia Biotech) y la temperatura de la placa de porcelana se mantuvo en 4 °C mediante un sistema Multi Temp III (Pharmacia Biotech). En los extremos del gel se colocaron

bandas de isoelectroenfoque (Pharmacia) impregnadas con NaOH 1 M (cátodo) y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M (ánodo). Las muestras se cargaron en la zona central de gel sobre papeles de aplicación de 5 x 2 mm (Pharmacia). Se emplearon volúmenes de igual actividad peroxidasa frente a 4MN. Las condiciones de la electroforesis para un gel de 6 cm fueron 1500 V, 12 mA y 7 W, que se ajustaron proporcionalmente en función de la longitud del gel. Se usó citocromo *c* como marcador de migración.

#### *Tinción de los geles*

La tinción de las isoenzimas de peroxidasa presentes en el gel se llevó a cabo empleando 4MN 1mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,33 mM en tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0. Los geles se incubaron durante 15 min a 25 °C y se lavaron con agua (Ferrer *et al.* 1990).

## 5. Caracterización de la actividad peroxidasa

### 5.1. *Determinación de la actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7)*

La actividad peroxidasa se ensayó *in vitro* en las muestras proteicas obtenidas en el apartado 4.3. determinando el cambio en la absorbancia en reacciones con diferentes sustratos: 4MN 1 mM ( $\epsilon_{593} = 21 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), siringaldazina 50  $\mu\text{M}$  ( $\epsilon_{530} = 27 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), alcohol coniferílico 100  $\mu\text{M}$  ( $\epsilon_{291} = 9,75 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) y alcohol sinapílico 100  $\mu\text{M}$  ( $\epsilon_{271} = 4,14 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Para ello se empleó un espectrofotómetro Helios  $\gamma$  (Thermo Electron Corporation). En los ensayos de muestras de fluido apoplástico se empleó el tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0, mientras que con las muestras de fluido simplástico se usó tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Como co-sustrato para todas las reacciones se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500  $\mu\text{M}$ .

### 5.2. *Detección histoquímica de la actividad peroxidasa*

Se sembraron las líneas seleccionadas y las plantas se mantuvieron en las condiciones indicadas en el apartado 4.2. Ocho semanas tras la siembra, los tallos se emplearon para obtener cortes transversales a 1 cm de la base del tallo de manera manual empleando cuchillas de bisturí del número 22.

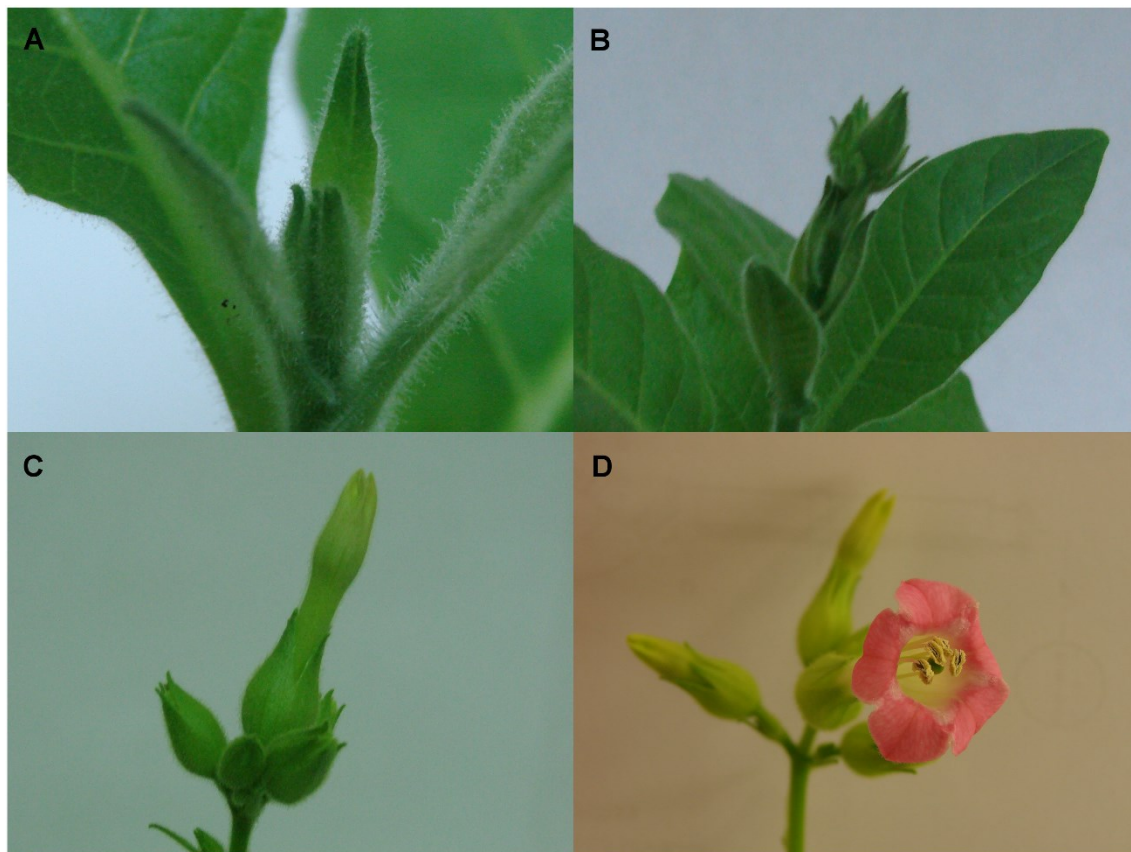
Los cortes se infiltraron en tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0 durante 5 min. A continuación, se tiñeron durante 10 min con TMB 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (actividad peroxidasa total) o siringaldazina 50  $\mu\text{M}$  (actividad peroxidasa tipo S). Los cortes y la tinción se

hicieron en fresco. Los cortes teñidos se observaron con un microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 y se fotografiaron empleando una cámara digital Nikon DXM1200 acoplada al mismo.

## **6. Estudio biométrico**

Las plantas de las líneas control y de sobreexpresión seleccionadas se sembraron en tierra (mezcla de turbas con fertilizante NPK) y se mantuvieron en una cámara de cultivo en condiciones controladas de 16 h de luz (23 °C) y 8 h en oscuridad (18 °C) con una intensidad de luz de 100  $\mu\text{moles}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

La longitud del tallo se midió cada tres días con un calibre digital DC01 TackLife (precisión: 0,01 mm). Para cada día de medida se determinó la media y el error estándar de cada línea.



**Figura III.5. Etapas de desarrollo floral de *N. tabacum*.** Durante la caracterización biométrica de las plantas se diferenciaron cuatro etapas de floración: A. Estado de pre-floración. B. Capullo formado. C. Flores emergentes. D. Flor abierta.

Al mismo tiempo, se determinó el estado de desarrollo floral de las plantas clasificándolo en vegetativo, pre-floración, con capullo, con flor emergente y con flor abierta (Fig. III.5).

## 7. Caracterización de las paredes celulares

### 7.1. Extracción de paredes

El material de partida utilizado fue el precipitado obtenido tras la extracción de proteínas (apartado 4.3.1). Se secó en estufa a 60 °C hasta obtener un peso estable, se molió con bolas de acero en un molino Mini-BeadBeater (Biospec Products) empleando tres pulsos de 30 s y se sometió a varios lavados de acuerdo a lo descrito por Espiñeira *et al.* (2011), con algunas modificaciones. Se emplearon cinco lavados con Tritón X-100 1%, dos con agua destilada, uno con etanol 70% y cuatro con etanol 96%, hasta que el sobrenadante quedó transparente. Tras cada lavado se recuperó el material por centrifugación (3200 *g* 10 min). Finalmente, para secar el precipitado, se lavó con etanol 96% y éter dietílico empleando un sistema de filtración Millipore. El material seco se consideró como la fracción de paredes celulares.

### 7.2. Cuantificación de ligninas por el método del bromuro de acetilo

A 3 mg de paredes celulares se les añadieron 500  $\mu$ L de una disolución 2,33 M de bromuro de acetilo en ácido acético. Esta mezcla se incubó a 70 °C durante 30 min. Tras dejar atemperar las muestras, se añadió 1 mL de NaOH 2 N y se ajustó a un volumen final de 10 mL con ácido acético. Se midió la absorbancia a 290 nm y para calcular la concentración de ligninas se usó un factor de absortividad de 20,091  $\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$  según la estimación de Iiyama & Wallis (1988).

### 7.3. Caracterización de ligninas mediante tioacidolisis

La composición de las ligninas se estudió mediante tioacidolisis (Rolando *et al.* 1992). Se incubaron 15 mg de paredes celulares junto con 10 mL de una disolución de  $\text{BF}_3$  eterato 0,2 M y etanotiol 1,31 M en dioxiano a 100 °C durante 4 h. Se dejaron enfriar las muestras, se paró la reacción con 30 mL de agua destilada y se ajustó el pH de la solución a un valor entre 3,0 y 4,0 empleando carbonato sódico 0,4 M. Esta mezcla se sometió a tres extracciones con 30 mL de diclorometano. Previamente, al volumen total

de diclorometano para cada extracción, 90 mL, se le añadieron 0,5 mg de tetracosano, que se empleó como estándar interno. Las fases orgánicas de cada extracción se juntaron y se añadió  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro para eliminar los restos de agua. Se filtró la mezcla y se evaporó a sequedad a 40 °C en un evaporador rotatorio (Buchi R-200). El residuo final se resuspendió en diclorometano y se pasó a viales para cromatografía de gases. Las muestras se evaporaron totalmente en los viales a 36 °C y una atmósfera de vacío durante 2 h empleando un SpeedVac Savant SPD121P (Thermo Scientific) conectado a una bomba de vacío FP110 (Thermo Scientific) y a una trampa de frío RVT4104 (Thermo Scientific). El residuo resultante se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  del agente derivatizador BSTFA y 10  $\mu\text{L}$  de piridina.

Los trimetil-silil derivados obtenidos se analizaron con un cromatógrafo de gases Thermo Finnigan Trace GC, equipado con una columna DB-XLB, J&W (60 m y 0,25 mm de diámetro interno). Se empleó helio como gas portador a un flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . El programa de temperatura empleado fue desde 90 °C hasta 270 °C, a una velocidad de 5 °C  $\text{min}^{-1}$ . La detección de compuestos se llevó a cabo con un espectrómetro de masas Thermo Finnigan Polaris Q acoplado al cromatógrafo, empleando una intensidad de impacto electrónico de 70 eV. La cromatografía GC-MS se llevó a cabo en la Unidad de Cromatografía de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidade da Coruña.

Para la determinación cuantitativa de los trimetil-silil derivados se emplearon como factores de respuesta los valores calculados por Yue *et al.* (2011): 0,42 para las unidades H ( $m/z = 239$ ), 0,47 para las G ( $m/z = 269$ ) y 0,53 para las S ( $m/z = 299$ ).

#### 7.4. Detección histoquímica de las ligninas

Se seleccionaron plantas y se hicieron cortes de la misma manera que en el apartado 5.2. Los cortes obtenidos se conservaron en agua destilada un máximo de 48 h a 4 °C hasta que se tiñeron. Para la observación de los cortes teñidos se empleó un microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 con una cámara digital Nikon DXM1200 acoplada para fotografiarlos.

#### 7.4.1. Reacción de Wiesner

Esta tinción detecta los grupos cinamaldehído presentes en las ligninas (Pomar *et al.* 2002). Los cortes se infiltraron durante 5 min en una solución de floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) al 1% (p/v) en HCl:etanol (25:75) (v:v) y se fotografiaron.

#### 7.4.2. Reacción de Mäule

Esta reacción permite diferenciar entre las unidades G y S de las ligninas (Strivastava 1966). Los cortes se infiltraron durante 5 min en una solución de KMnO<sub>4</sub> 1%. Tras un lavado con agua, se decoloraron durante 2 min en HCl 37% y se tiñeron con amoníaco 0,5 M. Se sumergieron en agua destilada y se fotografiaron.

#### 7.5. *Análisis de la composición de polisacáridos de pared*

Estos análisis fueron llevados a cabo por el grupo de Fisiología y Biotecnología de las Plantas de la Universidad de León.

#### 7.5.1. Cuantificación de celulosa

Para cuantificar la celulosa presente en las paredes se empleó el método de Updegraff (1969) usando las condiciones hidrolíticas descritas por Saeman *et al.* (1963). Se incubaron 10 mg de paredes en 3 mL de una mezcla de ácido acético:ácido nítrico:agua 8:1:2 (v:v:v) a 100 °C durante 30 min. A continuación, el residuo obtenido se hidrolizó con ácido sulfúrico al 72% a temperatura ambiente durante 3 h. Pasado este tiempo se diluyó el ácido sulfúrico hasta una concentración final de 1 M y se incubó la muestra a 110 °C durante 3 h. Finalmente, la glucosa liberada se cuantificó por el método de la antrona (Dische 1962), determinando la absorbancia a 620 nm e interpolando el valor obtenido en una recta patrón de glucosa.

#### 7.5.2. Contenido en ácidos urónicos

Se utilizó el método del *m*-hidroxidifenilo (Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973). A las muestras de paredes celulares se les añadió ácido trifluoroacético 2 M en una relación 5:1 y se incubaron durante 1 h a 121 °C. Se tomaron 0,4 mL de los azúcares resultantes y se incubaron con 2,4 mL de tetraborato sódico 12,5 mM en ácido sulfúrico concentrado durante 5 min a 100 °C. Tras dejar enfriar la mezcla se añadieron 20 µL de *m*-hidroxidifenilo. Pasados 5 min se midió la absorbancia a 520 nm frente a un blanco. Se preparó una recta patrón con ácido galacturónico para determinar el

contenido en ácidos urónicos (ácido galacturónico y ácido glucurónico) de las muestras.

### 7.5.3. Contenido en azúcares neutros

El contenido en azúcares neutros se llevó a cabo según lo descrito por Mérida *et al.* (2015). Las paredes celulares se hidrolizaron con ácido trifluoroacético 2 M en una proporción 5:1 durante 1 h a 121 °C. Los azúcares obtenidos se derivatizaron a acetatos de alditol (Albersheim *et al.* 1967) y se analizaron por cromatografía de gases con una columna capilar SP-2380 (30 mm x 0.25 mm, Supelco) utilizando un cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem.

### 7.6. *Análisis mediante espectroscopía de infrarrojos (FT-IR)*

Se obtuvo el espectro infrarrojo de las paredes celulares empleando un espectrofotómetro FT-IR Bruker Vector 22 (Bruker Optics), equipado con un módulo ATR de reflexión simple con un prisma de diamante Golden State (Specac), cuyo brazo se empleó para aplicar presión sobre las muestras, manteniéndola en contacto con el cristal sobre el que incide el haz de infrarrojos. Se utilizó el equipo disponible en la Unidad de Espectroscopía Molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidade da Coruña.

Se obtuvieron y analizaron los espectros de 10 réplicas biológicas obtenidas como se indica en el apartado 7.1. Para cada una de las réplicas biológicas se obtuvieron dos espectros. Antes de adquirir el espectro de cada muestra se hizo un blanco, registrando 32 espectros. Para cada réplica se obtuvieron 64 espectros entre 300 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Se empleó el programa OPUS 5.5 (Bruker) para corregir la línea base (*rubberband correction*) y normalizar los espectros (vectorial).

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales empleando la matriz de correlaciones para reducir el número de variables. Las puntuaciones factoriales obtenidas se obtuvieron para representar los diferentes casos en función de las mismas y determinar la homogeneidad de los grupos. Para llevar a cabo este análisis se empleó el paquete estadístico SPSS v17.0. A continuación, se realizó un FANOVA para comparar las curvas completas de las distintas líneas. Este análisis se realizó utilizando R v3.5.1 empleando las funciones FANOVA y fda.usc.



#### 8. Caracterización del comportamiento mecánico del tallo.

El comportamiento mecánico de las plantas se estudió mediante ensayos de tracción sometiendo los tallos de *N. tabacum* a distintas sollicitaciones mecánicas. Para ello se emplearon plantas de 8 semanas que crecieron en las condiciones indicadas en el apartado 3.4. Los ensayos se realizaron para 6 réplicas biológicas y fueron realizados por el grupo de Polímeros de la Universidade da Coruña.

Para ello se empleó una máquina universal de ensayos Instron 5566 con una capacidad de carga de 500 N, un rango de velocidades de 0,005 a 500 mm min<sup>-1</sup>, un recorrido total de la cruceta de 1135 mm y una precisión de la medida de la carga de  $\pm 0,01\%$  de la escala. Este equipo mide de manera continua y simultánea la fuerza instantánea aplicada y el alargamiento resultante. Los ensayos se realizaron con una velocidad de desplazamiento de las mordazas de 0,5 mm min<sup>-1</sup>, a temperatura ambiente.

Los datos de tensión ( $\sigma$ ) y deformación ( $\epsilon$ ), obtenidos mientras se realiza el ensayo a una temperatura y velocidad constante, se representaron en un diagrama cartesiano y se obtuvieron las curvas  $\sigma = \sigma(\epsilon)$  que varían con la naturaleza del material y con las condiciones de ensayo. En este análisis la fuerza de tracción fue aplicada sobre el eje principal del tallo de la planta.

#### 9. Caracterización de los metabolitos y las enzimas del ciclo ascorbato-glutación

##### 9.1. Obtención de muestras

Se sembraron las líneas como se indica en el apartado 4.2. Se tomaron muestras de hoja tres semanas tras la siembra. Se obtuvieron tres réplicas biológicas para cada línea y en cada una de ellas se empleó material de al menos tres plantas. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se analizaron el día de la recogida (ascorbato-glutación) o se guardaron a -80 °C (actividad enzimática). A continuación, se determinaron los niveles de expresión de *ZePrx* en estas muestras como se indica en el apartado 4.2.

### 9.2. Determinación de la actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7)

El tejido foliar se homogenizó en frío en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 KCl 1 M, EDTA 1 mM en una proporción 1:4 (p:v). Las muestras se centrifugaron 15 min a 20800 *g* a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, se dializó durante toda la noche frente a un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford y la actividad peroxidasa se ensayó *in vitro* en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 usando 4MN 1 mM como sustrato como se indica en el apartado 5.1.

### 9.3. Extracción del pool ascorbato-glutación

Las muestras se trituraron con nitrógeno líquido empleando un mortero y se homogeneizaron en ácido metafosfórico 5% en una relación 1:6 (p:v). Se centrifugaron a 20800 *g* durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se consideró el extracto de ascorbato y glutación (Locato *et al.* 2008).

El precipitado obtenido se resuspendió en una solución 1:1 (v:v) de NaOH 0,1 M y tampón sodio-fosfato 0,5 M pH 7,5 hasta completar el volumen recogido de sobrenadante. Se determinaron las proteínas totales en la solución resultante mediante el método de Bradford.

### 9.4. Cuantificación y determinación del estado redox del pool de ascorbato

Para cuantificar el contenido en ascorbato total, se mezclaron 100 µL del extracto obtenido con 250 µL de tampón sodio-fosfato 0,15 M con EDTA 5 mM pH 7,4 y 50 µL de DTT 10 mM, para reducir todo el ascorbato de la muestra a dehidroascorbato. Esta mezcla se incubó 10 min. A continuación se añadieron 50 µL de NEM 0,5%, 150 µL de TCA 10%, 200 µL de ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 44%, 200 µL de α-α' dipiridil 4% en etanol 70% y 50 µL de FeCl<sub>3</sub> 63 mg mL<sup>-1</sup> en TCA 10%. Esta mezcla se incubó 40 min a 40 °C. Tras la incubación se leyó la absorbancia a 525 nm frente a un blanco preparado de la misma manera en el que el volumen de extracto se sustituyó por ácido metafosfórico 5%. Para cuantificar el contenido en dehidroascorbato se procedió de la misma manera, a excepción de que los volúmenes de DTT 10 mM y NEM 0,5% se sustituyeron por agua destilada. Los valores de absorbancia se emplearon para calcular el contenido en ascorbato de las muestras de acuerdo con una recta patrón de ascorbato (de Pinto *et al.* 1999).

#### 9.5. Cuantificación y determinación del estado redox del pool de glutatión

Para cuantificar el contenido en glutatión total de las muestras se mezclaron 200  $\mu$ L del extracto obtenido en el apartado 9.4., 300  $\mu$ L de tampón sodio-fosfato 0,5 M pH 7,5 y 20  $\mu$ L de agua destilada. Para la cuantificación del glutatión oxidado se añadieron 20  $\mu$ L de 2-vinilpiridina en lugar del agua destilada. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante un mínimo de 60 min.

La solución obtenida tras la incubación se empleó como fuente de glutatión oxidado para una reacción *in vitro* de la enzima glutatión reductasa a 412 nm. Para ello se empleó un espectrofotómetro Helios  $\gamma$  (Thermo Electron Corporation). En estos ensayos se empleó tampón sodio-fosfato 143 mM pH 7,5 con EDTA 7,14 mM y DTNB 0,86 mM. En cada reacción se emplearon 700  $\mu$ l de este tampón, 5  $\mu$ L de NADPH 40 mM, a los que se añadió la solución obtenida previamente y se completó el volumen con agua destilada hasta 1 mL. La reacción se inició añadiendo tres unidades de enzima glutatión reductasa (Sigma). Los valores obtenidos durante 1 min de medida se compararon con los obtenidos durante el mismo tiempo sin añadir la enzima. La cuantificación del glutatión reducido generado se realizó comparando los diferenciales de absorbancia con una recta patrón de glutatión (de Pinto *et al.* 1999).

#### 9.6. Extracción de enzimas implicadas en el ciclo ascorbato-glutatión

El tejido foliar se trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta pulverizarlo y se homogeneizó con tampón Tris-HCl 50mM pH 7,5, cisteína 0,05% (p/v), seroalbúmina bovina 0,1% (p/v) y ácido ascórbico 1mM en una proporción 1:6 (p:v). Las muestras se centrifugaron 15 min a 20800 *g* a 4 °C y se recogió el sobrenadante (Locato *et al.* 2008). Se determinó el contenido en proteínas del sobrenadante mediante el método de Bradford.

#### 9.7. Determinación de la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión

Todas las actividades se determinaron registrando el cambio en la absorbancia durante al menos 1 min empleando un espectrofotómetro Helios  $\gamma$  (Thermo Electron Corporation). Las medidas de actividad se hicieron empleando el extracto proteico fresco de acuerdo a lo descrito por de Pinto *et al.* (2000).

9.7.1. Ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11)

La reacción *in vitro* se llevó a cabo en tampón Tris-acetato 100 mM pH 6,4. Como sustrato se empleó ácido ascórbico 350  $\mu\text{M}$  ( $\epsilon_{290} = 2,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y como co-sustrato peróxido de hidrógeno 170  $\mu\text{M}$ . Se determinó la variación de absorbancia a 290 nm.

9.7.2. Dehidroascorbato reductasa (EC 1.8.5.1)

Se empleó tampón sodio-fosfato 100 mM pH 6,4 como medio de reacción y, como sustratos, glutatión 2 mM y dehidroascorbato 1 mM ( $\epsilon_{265} = 13,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Este último se obtuvo mediante oxidación de ascorbato con  $\text{Br}_2$  a temperatura ambiente. Se determinó la variación de absorbancia a 265 nm. También se determinó esta variación para una muestra sin extracto enzimático para cuantificar la reacción no catalizada por la enzima.

9.7.3. Monodehidroascorbato reductasa (EC 1.6.5.4)

El tampón empleado fue Tris-HCl 50 mM pH 8 y se determinó la absorbancia a 340 nm y el sustrato, NADH 200  $\mu\text{M}$  ( $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). El co-sustrato necesario para la reacción, el monodehidroascorbato, se proporcionó de forma indirecta mediante la reacción acoplada de oxidación del ácido ascórbico catalizada por la enzima ascorbato oxidasa. Para ello, al medio de reacción se añadió ácido ascórbico 1 mM y 0,2 U de ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3) diluida en tampón sodio-fosfato 0,1 M pH 5,8.

9.7.4. Glutatión reductasa (EC 1.8.1.7)

La reacción se llevó a cabo en tampón sodio-fosfato 100 mM pH 7,2 y se determinó la absorbancia a 340 nm. Los sustratos empleados fueron NADPH 100  $\mu\text{M}$  ( $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y glutatión oxidado 1 mM.

9.7.5. Catalasa (EC 1.11.1.6)

La reacción se llevó a cabo en tampón sodio-fosfato 100 mM pH 7 empleando como sustrato peróxido de hidrógeno 38,67 mM ( $\epsilon_{240} = 23,43 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Se determinó la absorbancia a 240 nm (Locato *et al.* 2008).

## 10. Estudio del transcriptoma

### 10.1. *Obtención de muestras*

Se sembraron plantas de las líneas vv 15.14 y SE 7.2 en las condiciones descritas en el apartado 4.2. Se tomaron muestras de tallo de plantas de 6 semanas y se congelaron en nitrógeno líquido. Para cada línea se obtuvieron tres réplicas biológicas (una planta por réplica).

### 10.2. *Extracción de RNA*

Se extrajo el RNA total de los tallos de *N. tabacum* utilizando el kit de extracción Aurum™ Total RNA Mini Kit de Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante, que incluyen un paso de digestión con DNAsa para eliminar el DNA genómico. Se cuantificó el RNA y se verificó su calidad usando un Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies). Sólo se emplearon muestras con un RIN (RNA Integrity Number) superior a 7.

### 10.3. *RNA-Seq*

La generación de librerías, la secuenciación y el análisis de datos fueron llevados a cabo por Macrogen Inc. (República de Korea).

#### 10.3.1. Generación de librerías

Para la preparación de librerías se empleó el kit TruSeq RNA Sample Prep v2 (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante (Guía TruSeq RNA Sample Preparation v2 revision F Part #15026495). Durante este proceso cada una de las seis muestras se marcó con un adaptador diferente. Una vez preparada, las librerías se cuantificaron mediante qPCR y se determinó el tamaño medio de los fragmentos empleando un Bioanalizador 2100 (Agilent) con un Chip 1000 de DNA.

#### 10.3.2. Secuenciación de nueva generación

Se emplearon cantidades iguales del DNA obtenido tras la preparación de las librerías para la secuenciación de nueva generación (NGS). Esta se realizó con el kit TruSeq SBS v4 (Illumina) y se empleó un secuenciador Illumina HiSeq 2500 siguiendo las instrucciones del fabricante (HiSeq 2500 System User Guide Document #15035786 v01 HCS 2.2.70). Se llevó a cabo una secuenciación de tipo *paired-end* con una longitud de lectura de 101 pb.

### 10.3.3. Análisis de datos de secuenciación

La calidad de los datos obtenidos tras la secuenciación se evaluó con el programa FastaQC v0.11.5. A continuación, se eliminaron las secuencias de los adaptadores, las bases de los extremos de baja calidad y las lecturas menores de 36 pb empleando la opción SLIDINGWINDOW del software Trimmomatic 0.32 (Bolger *et al.* 2014).

Las secuencias depuradas se alinearon con el genoma de referencia (Edwards *et al.* 2017) empleando el programa HISAT2 v2.0.5 (Kim *et al.* 2015). A continuación, se ensamblaron los transcritos empleando StringTie v1.3.3b (Pertea *et al.* 2015). Una vez ensamblados, se estimó la abundancia de cada uno de ellos en FPKM (fragmentos por kilobase de transcrito por millón de lecturas) mediante la opción *-e* de StringTie (Pertea *et al.* 2016).

Para el análisis de genes diferencialmente expresados (GDE) se excluyeron los genes para los que al menos una muestra tenía un valor de 0 FPKM. A los valores de abundancia se les aplicó la transformación  $\log_2(\text{FPKM} + 1)$  y se normalizaron en función de los cuartiles utilizando la librería de R *preprocessCore*. Se calcularon los *foldchange* empleando Bioconductor de R para lo que se emplearon las muestras de la línea vv 15.14 como control. Se llevó a cabo una prueba T para muestras independientes y se identificaron como GDE los genes con un *foldchange* superior a 2 y un p-valor menor de 0,05. Los GDE se agruparon en base a su perfil de expresión mediante agrupamiento jerárquico (distancia euclídea y ligamiento completo).

### 10.4. *PCR en tiempo real*

Se diseñaron cebadores específicos empleando la aplicación on-line Primer3 (Untergasser *et al.* 2012), se comprobó mediante la aplicación BLAST (Altschul *et al.* 1990) la especificidad de los cebadores y se empleó el programa Oligo 6 para analizar la posible formación de horquillas y dímeros entre los cebadores de una pareja. Los cebadores resultantes, así como las secuencias a partir de las que se diseñaron se muestran en la tabla III.4. Como genes de referencia se emplearon  $\beta$ -Tubulina 1 -U91564.2- (Schmidt & Delaney 2010) y actina -AB158612- (Duwadi *et al.* 2015).

Se cuantificó el RNA y se verificó su calidad usando un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). A continuación, se obtuvo el cDNA empleando el iScript™ cDNA

Synthesis Kit (Bio-Rad). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se partió de 1 µg de RNA como molde y se empleó el cebador Oligo(dT)<sub>20</sub>.

Los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidade da Coruña.

Se realizaron ensayos de rango dinámico para determinar las eficiencias de los cebadores en los que se ensayaron 4 cantidades diferentes de cDNA (250, 125, 62,5 y 31,25 ng). La amplificación de los genes estudiados se llevó a cabo en una mezcla con FastStart SYBR Green Master (Roche) y los dos cebadores específicos para cada secuencia (Tabla III.4) a una concentración 0,3 µM cada uno, a la que se añadieron 125 ng de cDNA. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20 µL. Esta mezcla se incubó en un equipo CFX Maestro (Bio-Rad) empleando las condiciones indicadas en la tabla III.5. Al final del ensayo se realizó una curva de disociación elevando la temperatura de 65 a 95 °C en intervalos de 0,5 °C cada 10 s tras lo que se registró la fluorescencia para comprobar la especificidad de la amplificación. Los ensayos se realizaron por duplicado, empleando tres réplicas biológicas de cada una de las líneas transgénicas.

**Tabla III.4. Parejas de cebadores empleadas en la qPCR.** ID: código de identificación asignado en la anotación del genoma de *N. tabacum* (Edwards *et al.* 2017) excepto en el caso de los dos genes de referencia, para los que se indica el número de acceso de la base de datos del NCBI.

Gen	ID	Cebador	Secuencia	Eficiencia (%)
PAL	Nitab4.5_0000582g0180	NtPALF	GGGCATGGTCCACTAACACT	93
		NtPALR	CTTGCTCACAGCGGTTGATA	
MYB15	Nitab4.5_0006658g0010	NtMYB15F	GCTGGTGCCCATAGTACCTC	92
		NtMYB15R	TGCGAGTTCTCTTGCTGATG	
CesA4	Nitab4.5_0002389g0020	NtCesA4F	CTCATCCCACCAACCACTCT	90
		NtCesA4R	AAGAGAGGACCCCATGAACC	
GT43	Nitab4.5_0000669g0220	NtGT43F	AATTGAGGGATTTGGGACAT	93
		NtGT43R	ATGCCACCCATAAECTTCAG	
β-Tub1	U91564.2	NtBTub1F	GAAGGAATGGACGAGATGGA	100
		NtBTub1R	TTCACCTTCGTCATCAGCAG	
Actina	AB158612	NtActF	GGCATTGCAGATCGTATGAG	97
		NtActR	CCTTGATCTTCATGCTGCTG	

Los datos se analizaron empleando el programa CFX Maestro 1.1 (Bio-Rad), que se empleó para determinar la expresión relativa de cada uno de los genes de interés mediante el método de Pfaffl (Pfaffl 2001) para lo que se emplearon las eficiencias

determinadas tras los ensayos de rango dinámico que se indican en la Tabla III.4. El mismo programa informático se utilizó para llevar a cabo un ANOVA con el fin de detectar diferencias entre las líneas. Para llevar a cabo los análisis estadísticos se consideraron ambas líneas de vector vacío como control. Se empleó el test de Tukey para identificar las comparaciones significativamente distintas tras el ANOVA.

**Tabla III.5. Programa de PCR empleado en la qPCR.** Al final del mismo se realizó una rampa de temperatura (65 a 95 °C) para realizar las curvas de melting.

<b>Desnaturalización inicial</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Extensión</b>	<b>Extensión final</b>
95 °C 10 min	40	95 °C 30 s	55 °C 30 s	72 °C 1 min	72 °C 5 min

## **11. Análisis de datos**

En todos los ensayos realizados para los que no se indica de otra manera, todas las líneas de vector vacío se consideraron conjuntamente como control. Se empleó el test de Levene para determinar la igualdad de varianzas entre grupos y el test de Kolmogorov-Smirnov para estudiar la normalidad de los datos. En los casos en los que se cumplieron los supuestos de homocedasticidad y normalidad se realizó un ANOVA y se realizó el test de Dunnet para determinar qué líneas de sobreexpresión eran distintas al control. En los casos en los que no se cumplieron las hipótesis estructurales del ANOVA se emplearon las alternativas no paramétricas Kluskal-Wallis con una simulación Monte Carlo y el test de Dunn, para las comparaciones por parejas. Todos los análisis se llevaron a cabo empleando el software SPSS v17.0 y el SPSS v24.0 para realizar el test de Dunn. El nivel de confianza considerado fue de  $\alpha = 0,05$ .



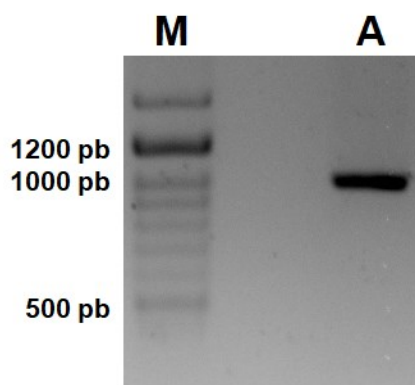
## ***IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---



### 1. Obtención de plantas transformantes

La región codificante de *ZePrx* se clonó mediante PCR partiendo de cDNA de los hipocotilos de *Z. elegans*, obteniéndose una banda de entre 900 y 1000 pb, compatible con el tamaño de la región codificante del gen (986 pb) (Fig. IV.1). Una vez purificado, el producto de PCR se introdujo, primero, en el vector pJIT62 y, a continuación, en el plásmido pGreen II 0179. De esta forma el gen *ZePrx* quedó bajo el control de un promotor y un terminador CaMV35S, que se escogió porque se usa habitualmente para sobreexpresar genes en plantas de forma constitutiva (El Mansouri *et al.* 1999; Jaggi *et al.* 2011; Passardi *et al.* 2006; Pedreira *et al.* 2011).



**Figura IV.1. Amplificación por PCR del cDNA de *ZePrx*.** M. Marcador, se indican los tamaños de tres de las bandas en pares de bases (pb). A. Amplicón obtenido tras la PCR con los cebadores *ZePrxCLOF* y *ZePrxCLOR* a partir de cDNA de *Z. elegans*.

Antes de proceder a la transformación de *A. tumefaciens* se secuenció el plásmido resultante, lo que permitió comprobar que la región codificante de *ZePrx* había sido clonada con éxito pero que esta presenta 3 mutaciones puntuales con respecto a las secuencias de referencia AJ88393 y AJ88395: 537C>T, 579A>G y 606T>C (Fig. A.1). Estas mutaciones, sin embargo, no causan ningún cambio en la secuencia aminoacídica codificada (Fig. A.2). Por lo tanto, se empleó este plásmido para transformar *A. tumefaciens*.

Se obtuvieron tres líneas de *A. tumefaciens*: una transformada con el vector pGreen II 0179 vacío (vv) y dos transformadas con el vector pGreen II 0179 con la

construcción promotor-*ZePrx*-terminador en su T-DNA (SE 1 y SE 2). Estas cepas de *A. tumefaciens* se usaron para transformar discos foliares de *N. tabacum*.

## **2. Selección de líneas transformantes**

### *2.1. Obtención de líneas transformantes homocigotas*

Tras la transformación de los discos foliares con *A. tumefaciens* se regeneraron 19 plantas transformadas con el vector vacío y 26 plantas transformadas con la construcción para la sobreexpresión de *ZePrx* (Tabla A.1). Las semillas obtenidas a partir de esta T1 y de la T2 se sometieron a ensayos de resistencia al antibiótico higromicina (Fig. IV.2) para aislar líneas de la T3 con una única inserción del T-DNA y homocigotas para la misma. Se descartaron las líneas con múltiples inserciones porque son más susceptibles de sufrir procesos de silenciamiento y, como consecuencia, presentar niveles de expresión inferiores a las líneas con una única inserción (Hobbs *et al.* 1990). Además, la segregación de múltiples *loci* complica la obtención de líneas homocigotas. Finalmente, en la T3, se identificaron 7 líneas homocigotas de vector vacío y 11 de sobreexpresión (Tabla A.2).

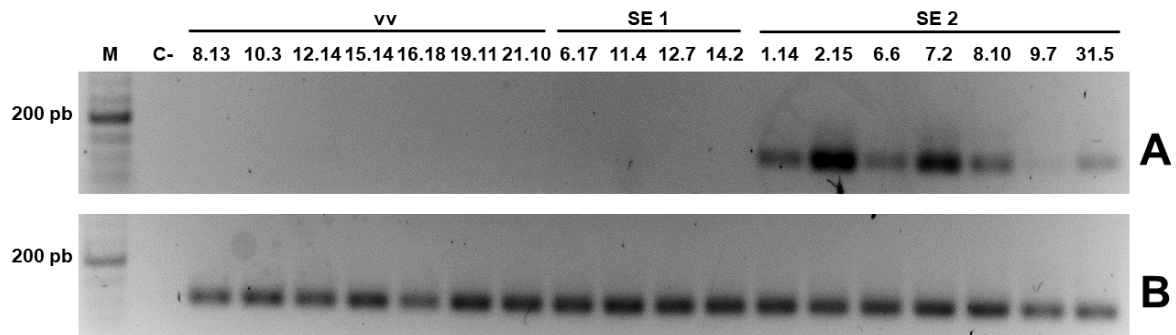


**Figura IV.2. Ensayos de resistencia a higromicina.** A. Plántulas de *N. tabacum* sensibles. B. Plántulas de *N. tabacum* resistentes.

### *2.2. Determinación de los niveles de expresión de ZePrx*

Se emplearon muestras de cDNA de tallos de plantas de 6 semanas para determinar la expresión del gen *ZePrx* en las líneas seleccionadas (aquellas que eran independientes, con una sola inserción y homocigotas).

Las líneas transformadas con la cepa de vector vacío y con la cepa SE 1 de *A. tumefaciens*, que porta el vector de transformación, no mostraron amplificación con los cebadores específicos para el gen *ZePrx*. Mientras que en el primer caso es lo esperado, en el segundo caso sí que se esperaba la expresión. Que las cuatro líneas SE 1 no mostrasen expresión de este gen puede ser indicativo de algún problema en esta cepa. Sin embargo, dado que el número de líneas obtenidas para esta cepa es bajo, no se pueden descartar otros factores que afectasen independientemente a cada una de las líneas, como fenómenos de silenciamiento. No obstante, estas cuatro líneas no se usaron para el estudio. En cambio, las líneas transformadas con la cepa SE 2, transformada con el vector de sobreexpresión, sí expresaban el gen *ZePrx*, a excepción de SE 9.7 y SE 6.6 en las que prácticamente no hubo amplificación (Fig. IV.3).



**Figura IV.3. Expresión de *ZePrx*.** Resultado de la rt-PCR semicuantitativa en muestras de tallo de plantas de 6 semanas de las diferentes líneas transgénicas obtenidas partiendo de la dilución 1/2 de cDNA. A. *ZePrx*. B.  $\beta$ -tubulina 1 (U91564.2). M. Marcador, se indica el tamaño en pb de la banda más intensa. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión.

Las diferencias en la expresión entre las distintas líneas no pueden explicarse porque el T-DNA se haya insertado en una región transcripcionalmente inactiva del genoma, ya que todas las líneas analizadas expresan el gen *HygR* a un nivel suficiente como para generar resistencia a la higromicina. Sin embargo, el gen *ZePrx* podría haber quedado bajo el control de secuencias reguladoras cercanas al T-DNA que reduzcan su expresión en algunas líneas (SE 9.7 y SE 6.6), ya que estas secuencias no afectarían a la expresión de *HygR* al estar insertados ambos genes en sentidos opuestos dentro del T-DNA (Fig. III.3). Sin embargo, diferentes estudios apuntan a que el lugar de inserción no es tan relevante a la hora de explicar los diferentes niveles de expresión entre líneas como posibles eventos de silenciamiento (Hobbs *et al.* 1990; Schubert *et al.* 2004). Una

posible causa de la activación de mecanismos de silenciamiento de transgenes es una alta expresión de los mismos (Schubert *et al.* 2004). En este caso, el propio promotor CaMV35S podría ser el responsable, ya que es capaz de generar altos niveles de expresión, que, en algunas líneas podrían haber superado el umbral necesario para desencadenar el silenciamiento. A pesar de que *HygR* también está controlado por un promotor CaMV35S, el umbral de activación de la maquinaria de silenciamiento no es el mismo para distintos genes, aunque estén dirigidos por el mismo promotor (Schubert *et al.* 2004).

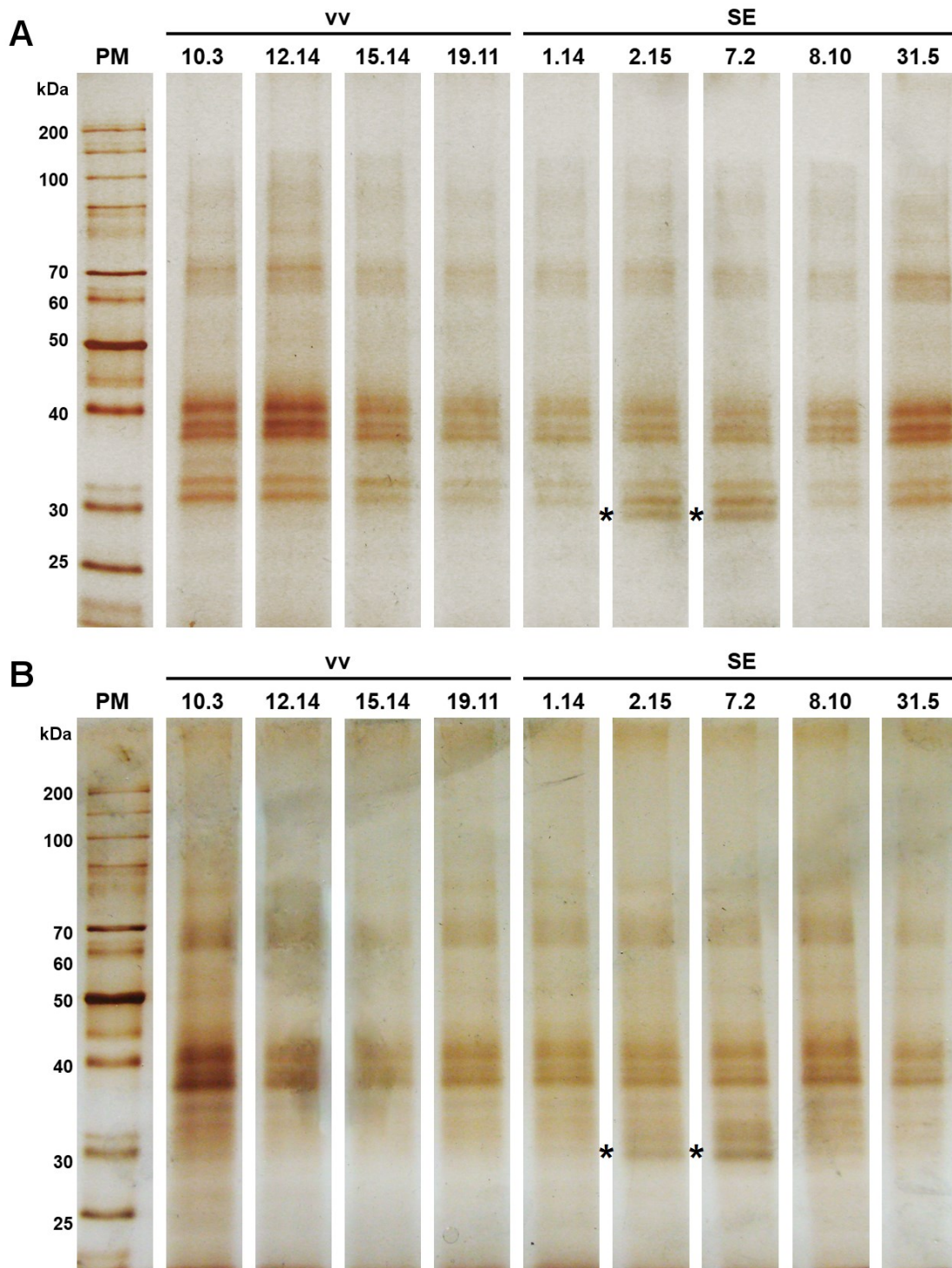
En base a estos resultados se continuó el análisis con las líneas transformadas con la cepa SE 2 que mostraron un nivel más alto de la expresión de *ZePrx*: SE 1.14, SE 2.15, SE 7.2, SE 8.10 y SE 31.5. Entre estas, las líneas SE 2.15 y SE 7.2 mostraron un nivel de expresión claramente superior al de las demás, mientras que SE 1.14, SE 8.10 y SE 31.5 mostraron niveles de expresión similares entre ellas (Fig. IV.3). Además, se seleccionaron cuatro líneas transformadas con la cepa de vector vacío (vv 10.3, vv 12.14, vv 15.14 y vv 19.11).

### 2.3. *Detección de ZePrx en muestras proteicas*

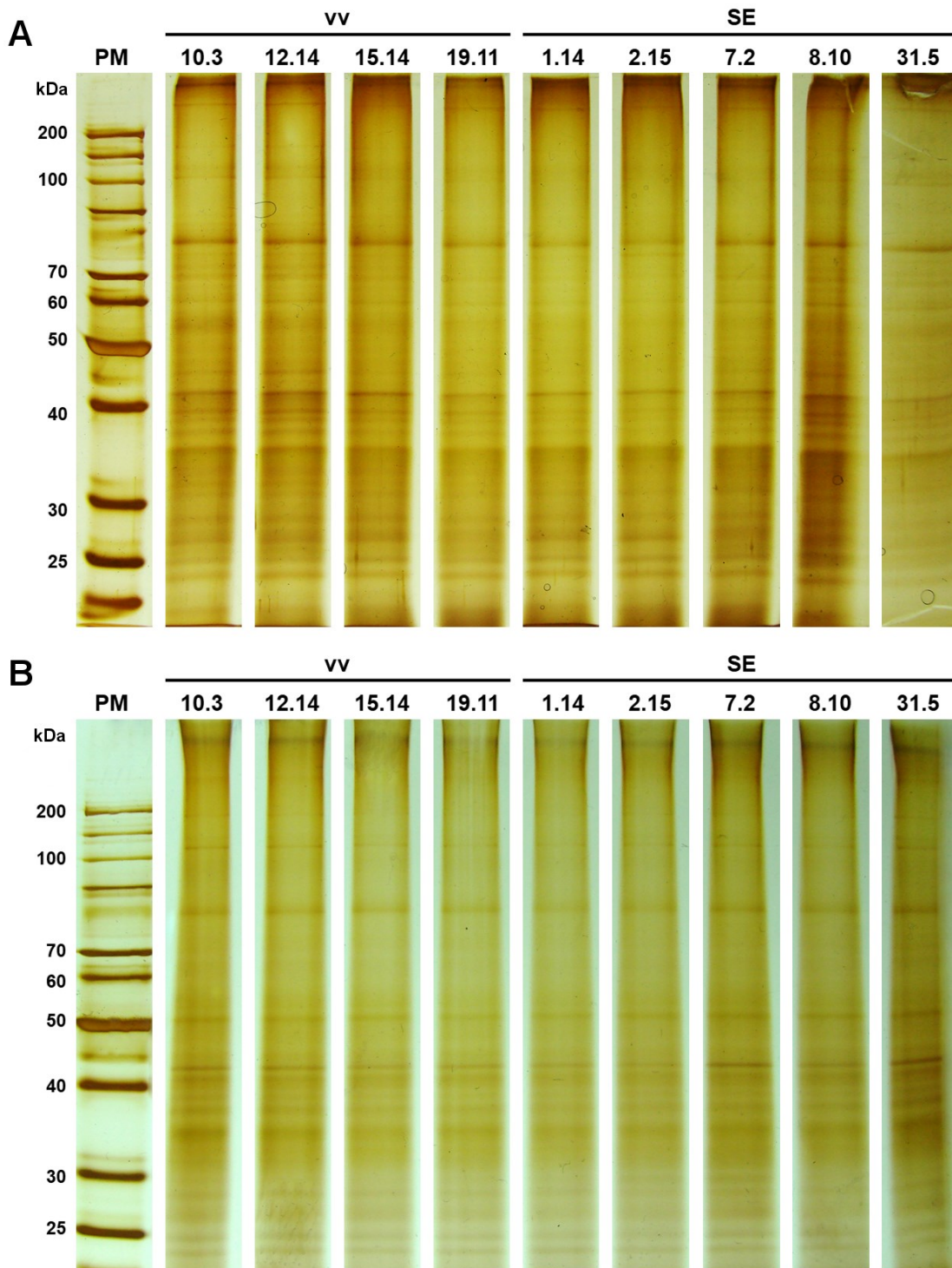
Se extrajeron las proteínas apoplásticas (solubles e iónicamente ligadas a la pared) y simplásticas de los tallos de plantas de 6 y 8 semanas de las líneas seleccionadas y se estudiaron mediante electroforesis disociante en SDS-PAGE e isoelectroenfoque en cinco líneas de sobreexpresión (SE 1.14, SE 2.15, SE 7.2, SE 8.10 y SE 31.5) y cuatro líneas de vector vacío (vv 10.3, vv 12.14, vv 15.14 y vv 19.11). Se escogieron estos dos puntos del desarrollo como representación de tallos que han iniciado la lignificación en la parte basal (6 semanas) y tallos con una lignificación más extendida y que están alcanzando el final de su desarrollo vegetativo (8 semanas).

#### 2.3.1. Electroforesis disociante (SDS-PAGE)

Los geles SDS-PAGE de las proteínas apoplásticas (Fig. IV.4) revelaron que las líneas SE 2.15 y SE 7.2, las líneas con mayor expresión de *ZePrx*, presentaban una banda adicional en torno a 30 kDa. Este peso molecular es algo inferior al determinado por Gabaldón *et al.* (2005) para las formas total (34,70 kDa) y parcialmente glucosiladas (33,44 kDa) y se aproxima más al determinado por Gabaldón *et al.* (2007) para la forma



**Figura IV.4. Patrón de proteínas del fluido apoplástico.** La separación se realizó mediante SDS-PAGE y revelado con nitrato de plata. A. 6 semanas. B. 8 semanas. PM: marcador de peso molecular. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión. Se señala con un asterisco (\*) la banda correspondiente a ZePrx.



**Figura IV.5. Patrón de proteínas del fluido simplástico.** La separación se realizó mediante SDS-PAGE y revelado con nitrato de plata. A. 6 semanas. B. 8 semanas. PM: marcador de peso molecular. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión.



no glucosilada de ZePrx. Se ha observado que las dos isoformas de ZePrx, con diferente nivel de glucosilación, muestran distinta actividad enzimática frente a los monolignoles (Gabaldón *et al.* 2005, 2006). Sin embargo, dada la posición superficial de los *N*-glucanos su función podría consistir en definir la localización de ZePrx dentro de la pared, y no ser imprescindibles para la actividad enzimática a pesar de que la influyen (Gabaldón *et al.* 2007). No obstante, las diferencias apreciadas en el peso molecular determinado mediante SDS-PAGE podrían deberse a diferencias en el protocolo experimental que modifiquen ligeramente la movilidad de la proteína.

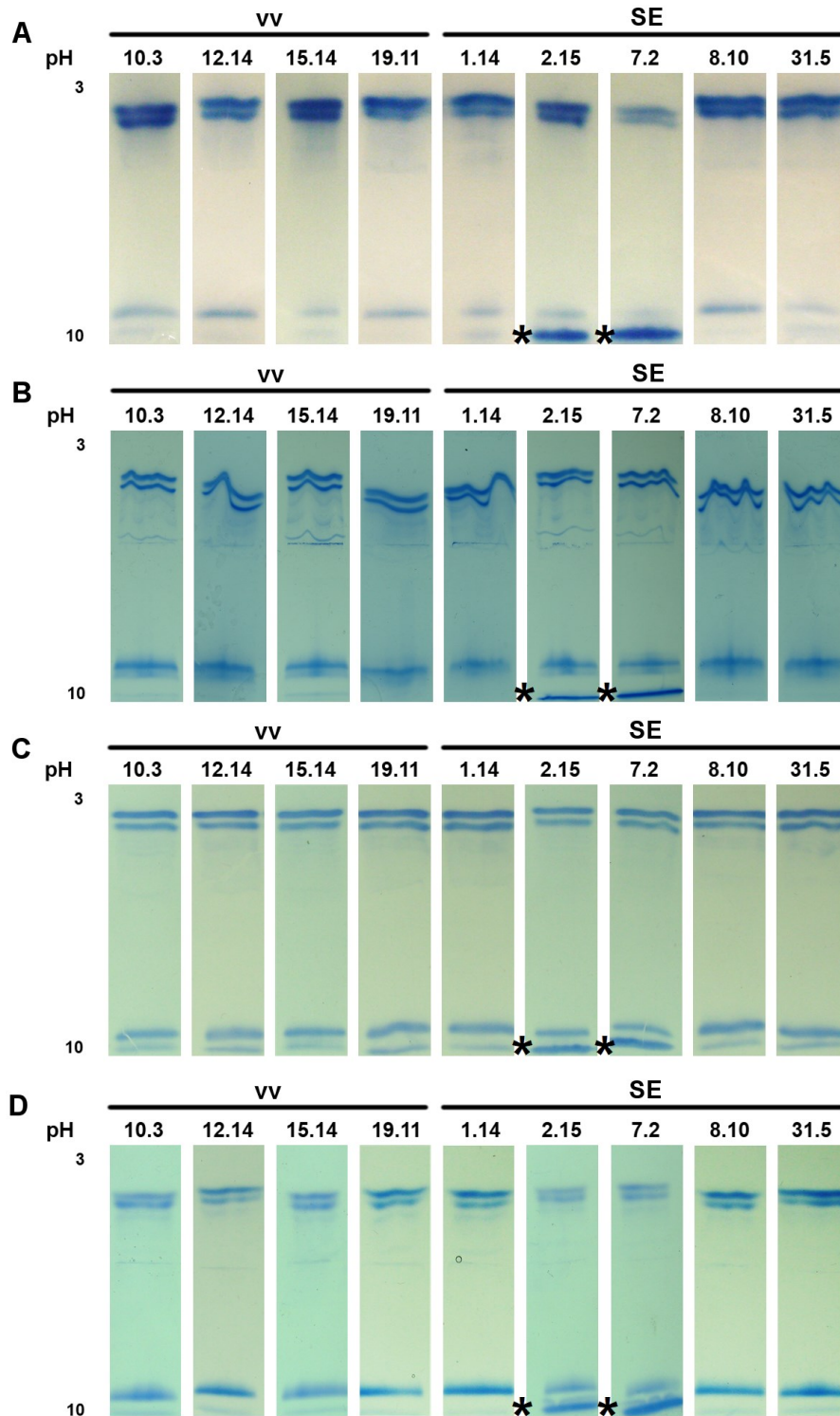
En el resto de líneas de sobreexpresión, SE 1.14, SE 8.10 y SE 31.5, no se observó ninguna banda adicional, lo que concuerda con el bajo nivel de expresión de *ZePrx* detectado por rt-PCR semicuantitativa (Fig. IV.3).

Por su parte, en las muestras de proteínas simplásticas (Fig. IV.5) no se apreciaron diferencias entre los patrones electroforéticos de las distintas líneas ni en las muestras de 6 ni en las de 8 semanas, lo que se corresponde con la presencia de un péptido señal en la secuencia de *ZePrx* y la localización apoplástica previamente descrita para esta enzima (Gabaldón *et al.* 2005).

### 2.3.2. Isoelectroenfoque (IEF)

Los patrones de isoenzimas obtenidos mediante isoelectroenfoque (Fig. IV.6) mostraron que las líneas SE 2.15 y SE 7.2 son las únicas que presentaban una banda adicional de pI fuertemente básico, cercano a 10, lo que se corresponde con la presencia en estas muestras de la enzima *ZePrx*, cuyo pI está en torno a 10 (Gabaldón *et al.* 2005). Por lo tanto, se confirmó lo observado tras la electroforesis en SDS-PAGE de que estas dos son las únicas líneas en las que la expresión de *ZePrx* es suficiente como para que se produzca la enzima en cantidades detectables en los geles.

A diferencia de los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE (Figs. IV.4-5), el isoelectroenfoque reveló la presencia de *ZePrx* tanto en el apoplasto como en el simplasto. Esto apunta a que el SDS-PAGE no permitió revelar la presencia de *ZePrx* en las muestras de simplasto por la mayor cantidad de proteínas presentes en este compartimento. Por lo que podemos deducir que *ZePrx* representa un pequeño porcentaje de las proteínas presentes en las muestras del simplasto. En cambio, dado



**Figura IV.6. Patrón de peroxidadas determinado mediante IEF.** Se revelaron las isoenzimas de peroxidada presentes en las distintas líneas transgénicas empleando 4MN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A. Apoplasto 6 semanas. B. Simplasto 6 semanas. C. Apoplasto 8 semanas. D. Simplasto 8 semanas. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión. Se señala con un asterisco (\*) la banda correspondiente a ZePrx.

que mediante isoelectroenfoque solo se revelan las isoformas de peroxidasa es más sencillo detectar la presencia de una nueva isoforma. No obstante, la presencia de ZePrx en las muestras de proteínas simplásticas no se corresponde con la localización apoplástica que ha sido observada previamente para esta proteína y que concuerda con la presencia de un péptido señal en su secuencia (Gabaldón *et al.* 2005). La presencia de esta proteína en el interior celular podría corresponderse con una contaminación por parte de la fracción apoplástica de las muestras de proteínas del simplasto.

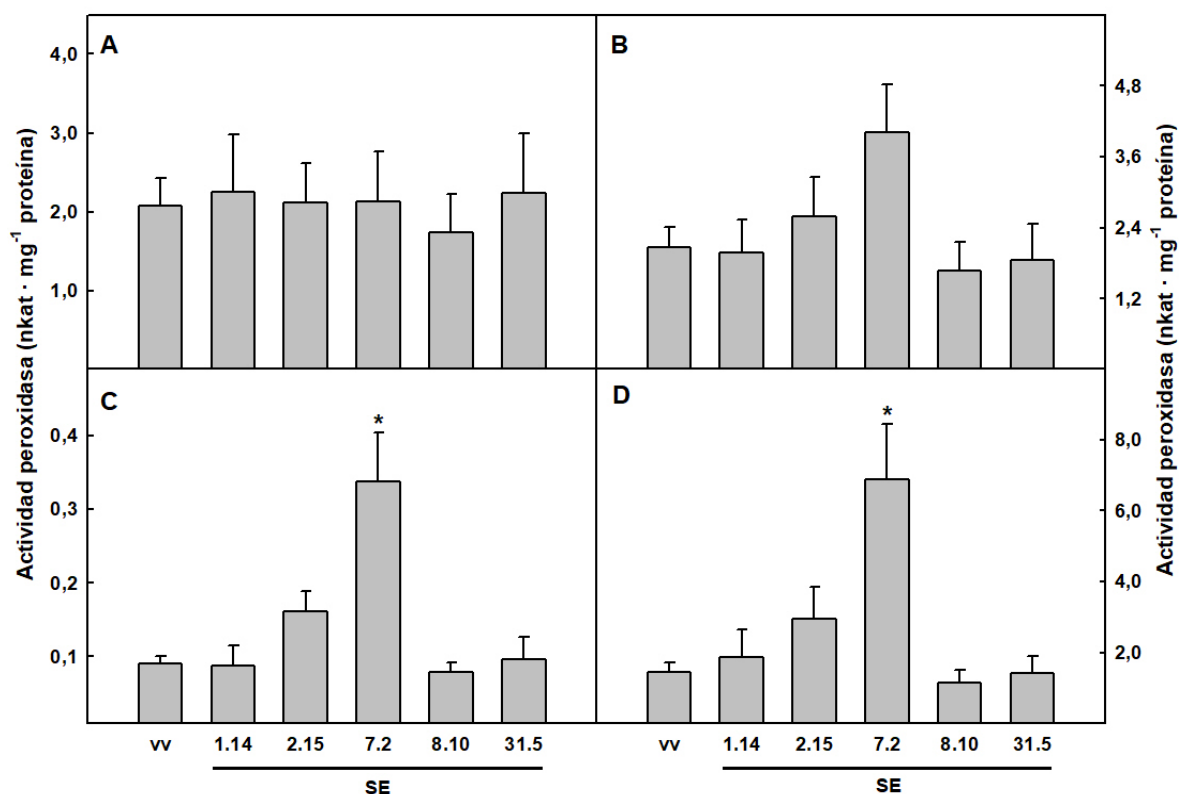
### 3. Caracterización de la actividad peroxidasa

#### 3.1. Determinación de la actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7)

Se determinó la actividad peroxidasa de las muestras de proteínas del apoplasto y del simplasto de los tallos de *N. tabacum* de 6 y 8 semanas con cuatro sustratos diferentes: dos precursores de las ligninas (alcoholes coniferílico y sinapílico) y dos sustratos no fisiológicos (4MN y siringaldazina) en las líneas estudiadas electroforéticamente: cuatro de vector vacío y cinco de sobreexpresión.

Las medidas de actividad empleando como sustrato el alcohol coniferílico no mostraron diferencias significativas con respecto a la media de las líneas control en ninguno de los compartimentos subcelulares (apoplasto y simplasto) ni a ninguno de los tiempos ensayados (6 y 8 semanas) (Figs. IV.7-10). En cambio, en el caso del alcohol sinapílico, la actividad peroxidasa media fue superior en la línea SE 7.2 a la media de las líneas de vector vacío en las cuatro muestras estudiadas: apoplasto y simplasto a 6 y 8 semanas (Figs. IV.7-10). Aunque solo se detectaron diferencias significativas entre esta línea y las de vector vacío en las muestras de proteínas del simplasto (Figs. IV.8 y IV.10).

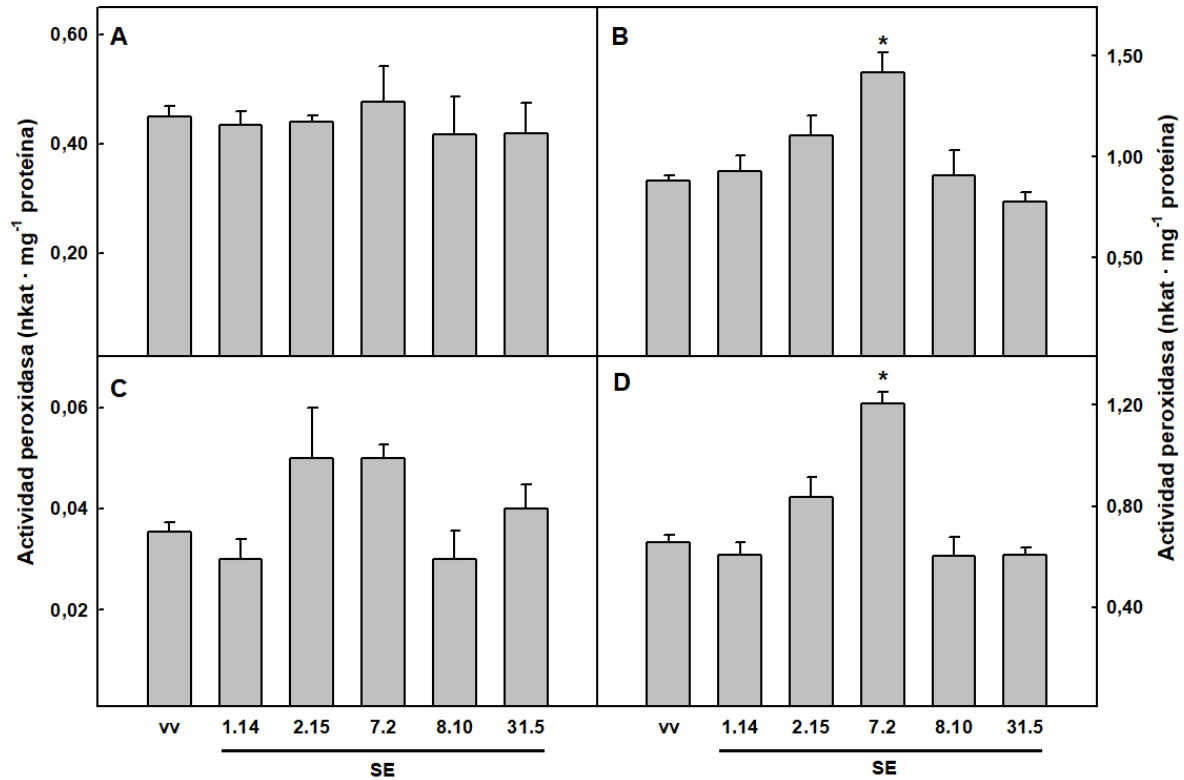
Estos resultados apuntan a que en la línea SE 7.2 la sobreexpresión de la peroxidasa básica de *Z. elegans* ha causado un incremento en la actividad siringil-peroxidasa mientras que no hay cambios en la actividad guaiacil-peroxidasa, lo que concuerda con la capacidad de ZePrx de oxidar el alcohol sinapílico (Gabaldón *et al.* 2005). El aumento de la actividad siringil-peroxidasa se apreció mejor al calcular el



**Figura IV.7. Actividad peroxidasa en el apoplasto del tallo de plantas de 6 semanas.** Se determinó la actividad peroxidasa específica empleando 4 sustratos diferentes. A. Alcohol coniferílico. B. Alcohol sinapílico. C. 4MN. D. Siringaldazina. vv: vector vacío (media de 4 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media de la actividad peroxidasa con cada sustrato  $\pm$  error estándar.  $n(\text{línea}) = 3$ . Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

ratio entre la actividad siringil-peroxidasa y la guaiacil-peroxidasa. De esta manera, se encontraron diferencias significativas en todas las muestras (apoplasto y simplasto de 6 y 8 semanas), siendo en todas ellas este ratio superior en la línea SE 7.2 y, en el caso de las muestras de 8 semanas, también en la línea SE 2.15 (Fig. IV.11). Estos resultados sugieren que la presencia de ZePrx ha modificado la actividad peroxidasa en las plantas transformadas de *N. tabacum*. En el apoplasto, el ratio siringil-guaiacil peroxidasa (ratio S/G peroxidasa) en la línea SE 7.2 aumentó (Fig. IV.11) a pesar de que la actividad frente al alcohol sinapílico en estas muestras no se incrementó de forma significativa, aunque sí presentó un mayor valor medio de actividad frente a este sustrato (Figs. IV.7 y IV.9). Estos datos, en conjunto, apuntan a que la actividad siringil-peroxidasa en el apoplasto ha aumentado pero que el cambio en el valor absoluto ha sido demasiado pequeño como para poder detectarse como significativo dado el tamaño muestral

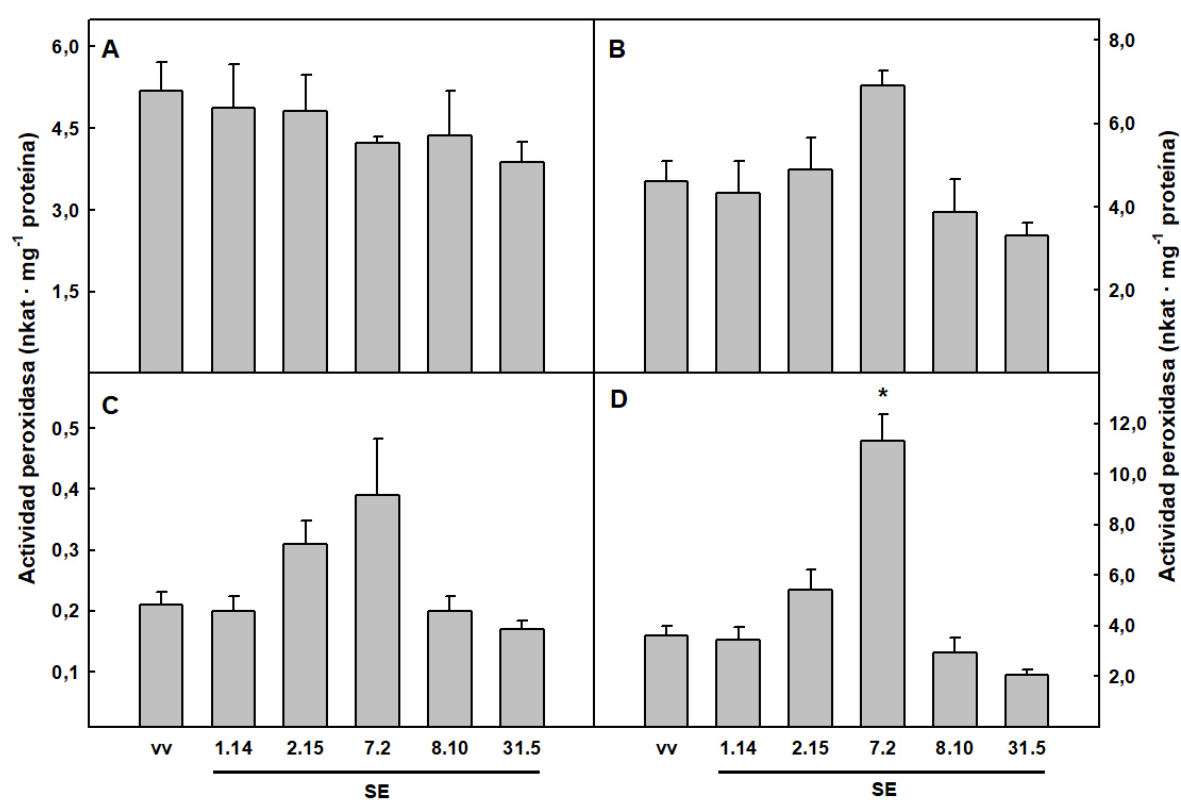
empleado (Aarts *et al.* 2014). Por otro lado, que la sobreexpresión de *ZePrx* tenga un efecto pequeño sobre la actividad peroxidasa total es coherente con el gran número de peroxidases de clase III codificadas por el genoma de *N. tabacum*, 147 (Fawal *et al.* 2013).



**Figura IV.8. Actividad peroxidasa en el simplasto del tallo de plantas de 6 semanas.** Se determinó la actividad peroxidasa específica empleando 4 sustratos diferentes. A. Alcohol coniferílico. B. Alcohol sinapílico. C. 4MN. D. Siringaldazina. vv: vector vacío (media de 4 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media de la actividad peroxidasa con cada sustrato  $\pm$  error estándar.  $n(\text{línea}) = 3$ . Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

En el caso de los sustratos sintéticos se observaron más cambios en dos de las líneas de sobreexpresión (SE 2.15 y SE 7.2) que en los ensayos de actividad peroxidasa empleando monolignoles como sustratos. Por un lado, la actividad frente a 4MN resultó ser de media más alta en estas dos líneas que en las líneas de vector vacío en los cuatro tipos de muestras ensayadas (apoplasto y simplasto de plantas de 6 y 8 semanas) (Figs. IV.7-10). Sin embargo, este incremento solo fue significativo en la línea SE 7.2 en las muestras de apoplasto de 6 semanas (Fig. IV.7) y en las de simplasto de 8 semanas (Fig. IV.10). Por otro lado, en los cuatro tipos de muestras se observó un aumento

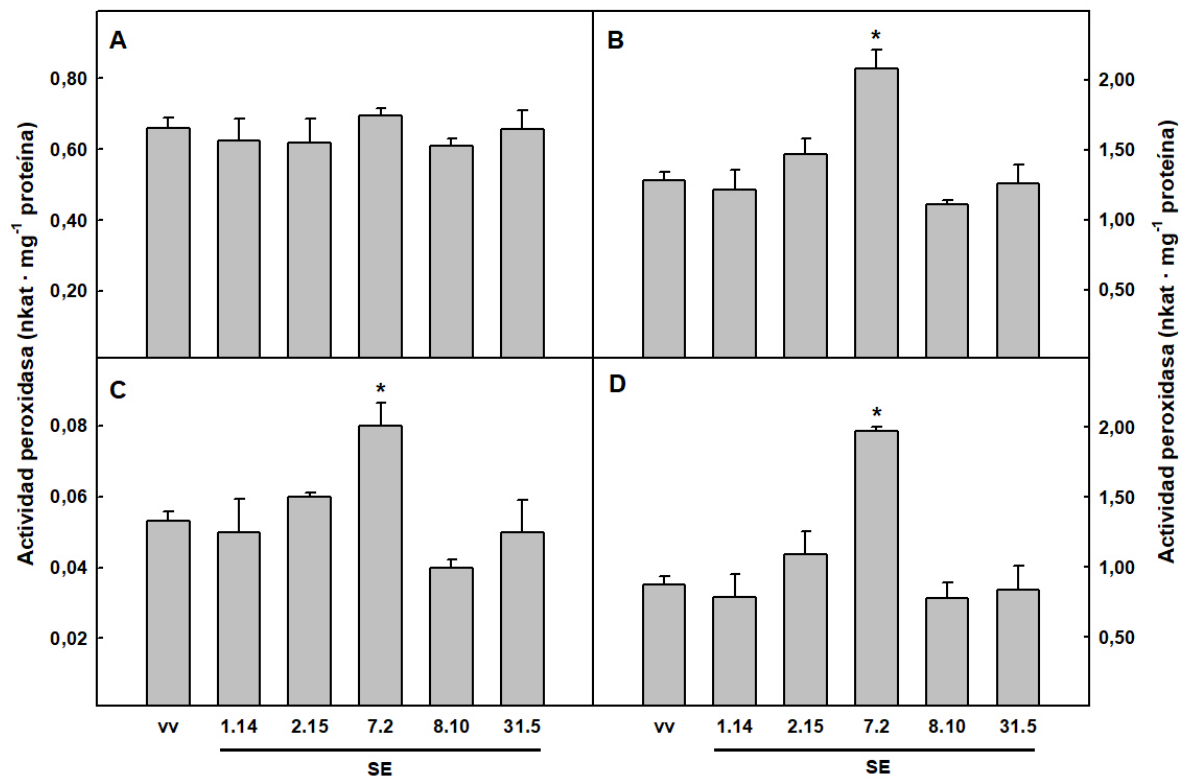
significativo de la actividad medida con siringaldazina en la línea SE 7.2 con respecto a las líneas de vector vacío (Figs. IV.7-10). Al igual que en el caso de la actividad frente a alcohol sinapílico (Figs. IV.7-10), el aumento en todas las muestras de la actividad medida con siringaldazina concuerda con la presencia de ZePrx, que muestra una alta eficiencia oxidando los sustratos hidroximetilados en el carbono 5 como el alcohol sinapílico y la siringaldazina gracias a que carece de la hélice D', entre otras modificaciones (Ros Barceló *et al.* 2007). Esta estructura característica tiene como consecuencia que presente un centro activo más relajado, sin restricciones estéricas como las que existen en las peroxidasas de tipo G (Østergaard *et al.* 2000).



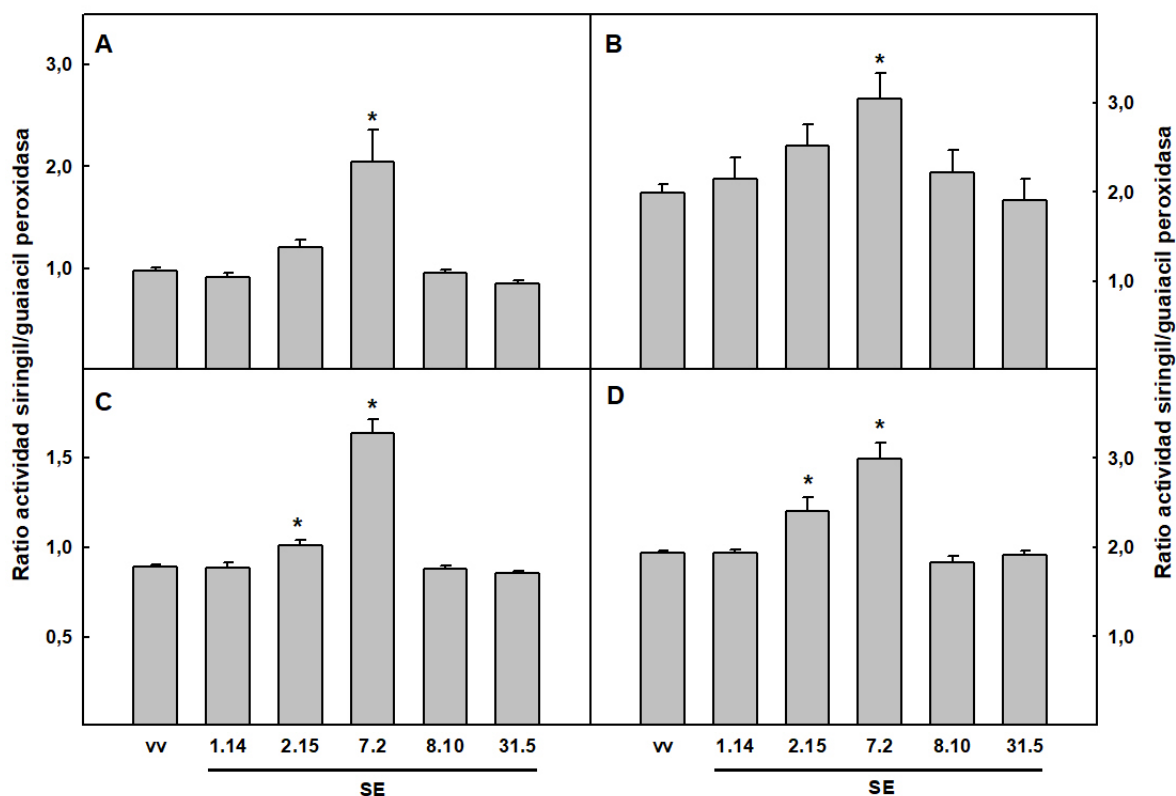
**Figura IV.9. Actividad peroxidasa en el apoplasto del tallo de plantas de 8 semanas.** Se determinó la actividad peroxidasa específica empleando 4 sustratos diferentes. A. Alcohol coníferico. B. Alcohol sinapílico. C. 4MN. D. Siringaldazina. vv: vector vacío (media de 4 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media de la actividad peroxidasa con cada sustrato  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

En resumen, la línea SE 7.2 presentó un incremento de la actividad media con respecto a las líneas de vector vacío frente a alcohol sinapílico, 4MN y siringaldazina, así como un incremento en el ratio S/G peroxidasa en todas las muestras ensayadas

(apoplasto y simplasto de plantas de 6 y 8 semanas). Mientras que no se detectaron diferencias significativas para todas ellas con los dos primeros sustratos, en el caso de la siringaldazina y el ratio S/G sí que se detectaron diferencias en los cuatro tipos de muestras empleadas (Figs. IV.7-11). Por otro lado, la línea SE 2.15 solo presentó un incremento significativo del ratio S/G peroxidasa en las muestras de proteínas a 8 semanas, aunque a 6 semanas la media para esta línea es superior que para las líneas control (Fig. IV.11). Estas dos líneas, SE 2.15 y SE 7.2, son las que presentaron una banda adicional tanto en los geles SDS-PAGE de las proteínas apoplásticas (Fig. IV.4) como en el IEF (Fig. IV.6), por lo que los cambios en la actividad peroxidasa de estas muestras pueden achacarse a la presencia de ZePrx.



**Figura IV.10. Actividad peroxidasa en el simplasto del tallo de plantas de 8 semanas.** Se determinó la actividad peroxidasa específica empleando 4 sustratos diferentes. A. Alcohol coniferílico. B. Alcohol sinapílico. C. 4MN. D. Siringaldazina. vv: vector vacío (media de 4 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media de la actividad peroxidasa con cada sustrato  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura IV.11. Ratio de actividad siringil-peroxidasa/guaiacil-peroxidasa.** Se calculó el ratio entre la actividad específica obtenida utilizando como sustratos alcohol sináplico y alcohol coniferílico en proteínas solubles e iónicamente ligadas a la pared del apoplasto y solubles del simplasto para los dos tiempos. A. Apoplasto 6 semanas. B. Simplasto 6 semanas. C. Apoplasto 8 semanas. D. Simplasto 8 semanas. vv: vector vacío (media de 4 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media de la actividad peroxidasa con cada sustrato  $\pm$  error estándar.  $n(\text{línea}) = 3$ . Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

A pesar de que estas dos líneas también son las que presentaron unos mayores niveles de expresión de *ZePrx* (Fig. IV.3), se observó que los niveles de mRNA de *ZePrx* no pueden explicar bien los valores de actividad peroxidasa observados. En la línea SE 2.15 se detectó una mayor cantidad de cDNA de *ZePrx* que en SE 7.2 (Fig. IV.3), y, sin embargo, fue la que presentó una menor variación en la actividad peroxidasa con respecto al control (Figs. IV.7-10). Esta falta de concordancia entre los niveles de mRNA de un gen sobreexpresado y la actividad peroxidasa total han sido observados en otros trabajos (Elfstrand *et al.* 2002; Kumar *et al.* 2012; Wu *et al.* 2017). En algunos casos se ha observado, como ocurre con SE 2.15, que líneas con altos niveles de expresión del transgén mostraron una actividad peroxidasa similar a la del control (Kumar *et al.*



2012). Esta aparente discrepancia podría explicarse si en la planta se están activando mecanismos de regulación para controlar la actividad peroxidasa total. En este caso, dado que la expresión de *ZePrx* en SE 2.15 fue más alta, podría haber dado lugar a una activación de estos mecanismos de forma más intensa que en la línea SE 7.2, resultando en valores de actividad peroxidasa semejantes a los de las plantas control. Esta regulación podría consistir en una represión de otras peroxidasas de clase III, ya sea a nivel de mRNA o a nivel de proteína. A nivel transcripcional, la expresión de las peroxidasas puede estar regulada, entre otros factores por los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este compuesto puede actuar generando un bucle de retroalimentación negativa, al ser capaz de inducir la expresión de estas enzimas y, posteriormente, servirles de sustrato (Gómez-Ros *et al.* 2012; Herrero *et al.* 2014; Kim *et al.* 2003). No obstante, esta regulación también podría tener lugar a nivel de la traducción (Merchante *et al.* 2017). A este nivel existen diversos mecanismos de control de la expresión, siendo uno de ellos dependiente de co-factores. Este es el caso de las catalasas cuya traducción está regulada, entre otros factores, por la disponibilidad del grupo hemo para generar la enzima activa, lo que resulta en un control de los niveles totales de esta actividad enzimática (Schmidt *et al.* 2002). En los geles SDS-PAGE (Fig. IV.4) e IEF (Fig. IV.6) la banda correspondiente a *ZePrx* mostró una intensidad similar en ambas líneas, lo que sugiere, al igual que los resultados de actividad peroxidasa, que el mRNA de *ZePrx* está siendo traducido con diferente eficiencia en las dos líneas de sobreexpresión.

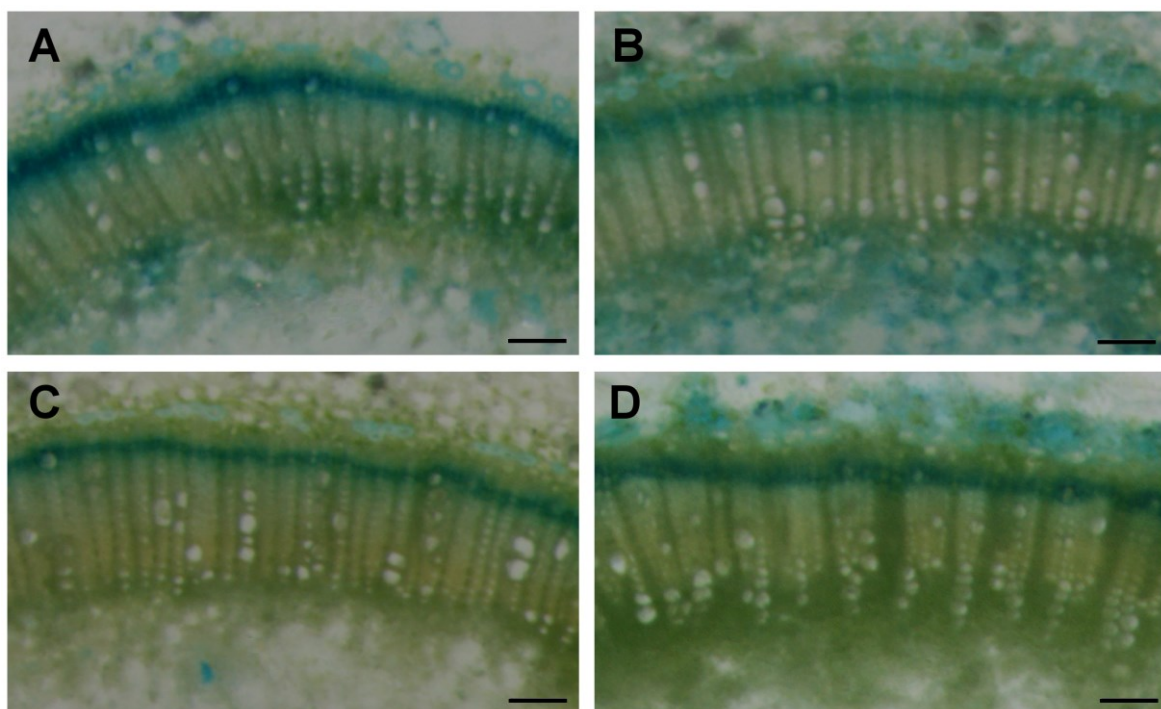
El hecho de que la actividad peroxidasa frente a los monolignoles haya sufrido menos cambios en la planta que frente a los demás sustratos ensayados puede indicar que existen mecanismos de control destinados a evitar un exceso de este tipo de actividad en las plantas. Esta idea es coherente con el hecho de que la oxidación de los monolignoles y su incorporación a las ligninas es un paso irreversible en esta ruta de biosíntesis, provocando una fijación permanente de carbono, ya que las plantas no poseen enzimas capaces de degradar las ligninas (Pollegioni *et al.* 2015).

Por su parte, en las líneas SE 1.14, SE 8.10 y SE 31.5 no se detectaron cambios en el SDS-PAGE, el IEF o la actividad peroxidasa, mostrando un comportamiento similar a los de las líneas transformadas con el vector vacío. Por lo tanto, los resultados en estas líneas apoyan que el cambio en el ratio S/G peroxidasa observado en las líneas SE 2.15 y SE 7.2 se debe a la presencia de *ZePrx* en el proteoma de las plantas de estas

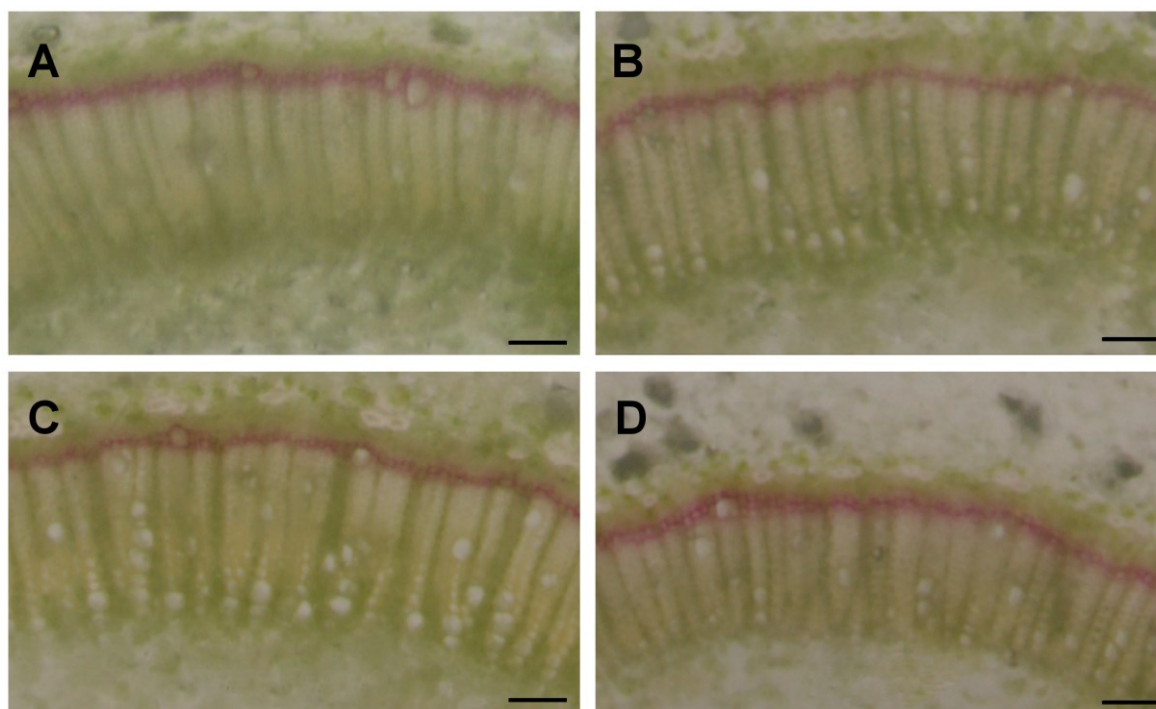
líneas. Mientras que en las tres líneas de sobreexpresión restantes, el bajo nivel de expresión de *ZePrx* no llega a ser suficiente como para que haya una producción apreciable de la enzima.

### 3.2. Detección histoquímica de la actividad peroxidasa

Tras constatar un aumento de la actividad peroxidasa frente a alcohol sinapílico, 4MN y siringaldazina en tallos de las plantas de la línea SE 7.2 y un aumento del ratio S/G en las líneas de sobreexpresión en las que se detectó la presencia de *ZePrx* (SE 2.15 y SE 7.2), se estudió la distribución de la actividad peroxidasa en secciones transversales del tallo de dos líneas de vector vacío (vv 10.3 y vv 15.14) y estas dos líneas de sobreexpresión (SE 2.15 y SE 7.2). Para ello se tiñeron cortes de la base de los tallos de plantas de 8 semanas con dos sustratos: TMB y siringaldazina. Mientras que el primero informa sobre la actividad peroxidasa total, de forma similar al 4MN, la siringaldazina es un análogo del alcohol sinapílico que solo puede ser oxidado por



**Figura IV.12. Detección histoquímica de la actividad peroxidasa total.** Actividad peroxidasa en secciones transversales de tallos de 8 semanas de *N. tabacum* empleando como sustrato TMB. A. vv 10.3. B. vv 15.14. C. SE 2.15. D. SE 7.2. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión. La barra horizontal se corresponde con 125  $\mu\text{m}$ .



**Figura IV.13. Detección histoquímica de la actividad peroxidasa de tipo S.** Actividad peroxidasa en secciones transversales de tallos de 8 semanas de *N. tabacum* empleando como sustrato siringaldazina. A. vv 10.3. B. vv 15.14. C. SE 2.15. D. SE 7.2. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión. La barra horizontal se corresponde con 125  $\mu\text{m}$ .

peroxidases de tipo S (Ros Barceló *et al.* 2007). El peróxido de hidrógeno necesario como co-sustrato para la reacción fue proporcionado de manera endógena por las células del sistema vascular (Ros Barceló 1998).

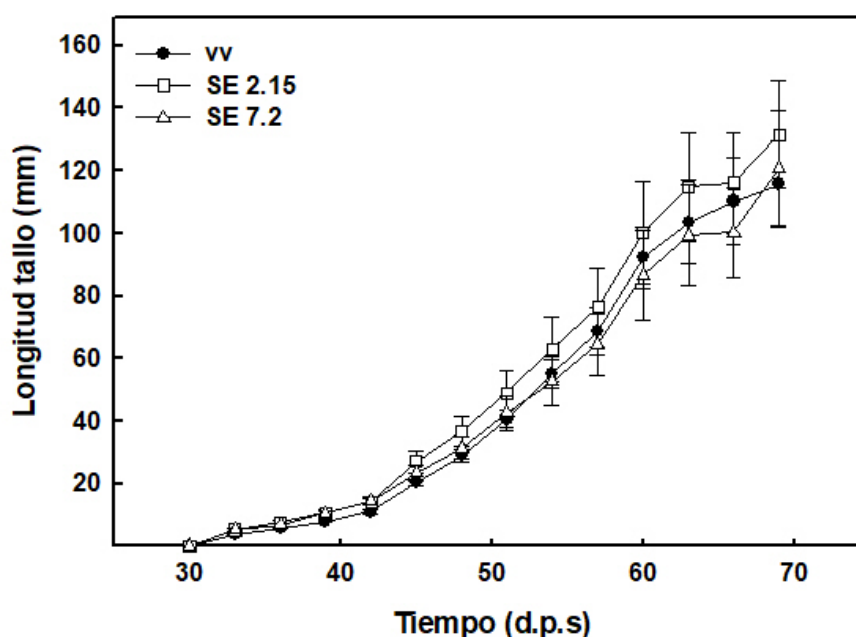
Con ninguno de los dos sustratos se detectaron diferencias en la tinción entre las líneas de vector vacío y las de sobreexpresión (Figs. IV.12-13). Estos resultados contrastan con los obtenidos para la determinación de la actividad peroxidasa *in vitro* (Figs. IV.7-10), especialmente en el caso de la siringaldazina, frente a la que sí se encontraron diferencias significativas en el caso de la línea SE 7.2 tanto en las proteínas apoplásticas como simplásticas a los dos tiempos ensayados. En estudios similares (Elfstrand *et al.* 2002) en los que la sobreexpresión de peroxidases de clase III provocó un incremento de la actividad peroxidasa *in vitro*, se observó también un aumento de la tinción de las secciones de tallo con guaiacol. No obstante, en este caso la tinción se llevó a cabo añadiendo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en lugar de emplear únicamente el de formación endógena. Por lo tanto, la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  podría estar ejerciendo de factor

limitante a la hora de detectar la actividad mediante la tinción histoquímica, no permitiendo observar las diferencias apreciadas *in vitro*. Además, al detectar la actividad peroxidasa cercana a los lugares de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estamos obviando la contribución de otros tejidos del tallo. Estos sí que contribuyen a la actividad peroxidasa *in vitro* y, previsiblemente, *ZePrx* se estaría expresando en todos ellos ya que hemos escogido un promotor constitutivo para dirigir su expresión (Odell *et al.* 1985). Por lo tanto, puede que el aumento total de la actividad en el conjunto del tallo sea suficiente como para ser detectada *in vitro*, pero que el aumento relativo asociado al cilindro vascular sea demasiado pequeño como para detectarse de forma histoquímica.

#### **4. Estudio biométrico**

La sobreexpresión de peroxidasas de clase III, en ocasiones, ha tenido como resultado la alteración del crecimiento o el desarrollo de las plantas modificadas (Elfstrand *et al.* 2001; Fernández-Pérez *et al.* 2015; Herrero *et al.* 2013; Pedreira *et al.* 2011). Por ello, se estudió el crecimiento en altura y el desarrollo floral de las cuatro líneas seleccionadas con el fin de determinar si estos parámetros se veían afectados en las líneas de estudio por la expresión de la peroxidasa básica de *Z. elegans*.

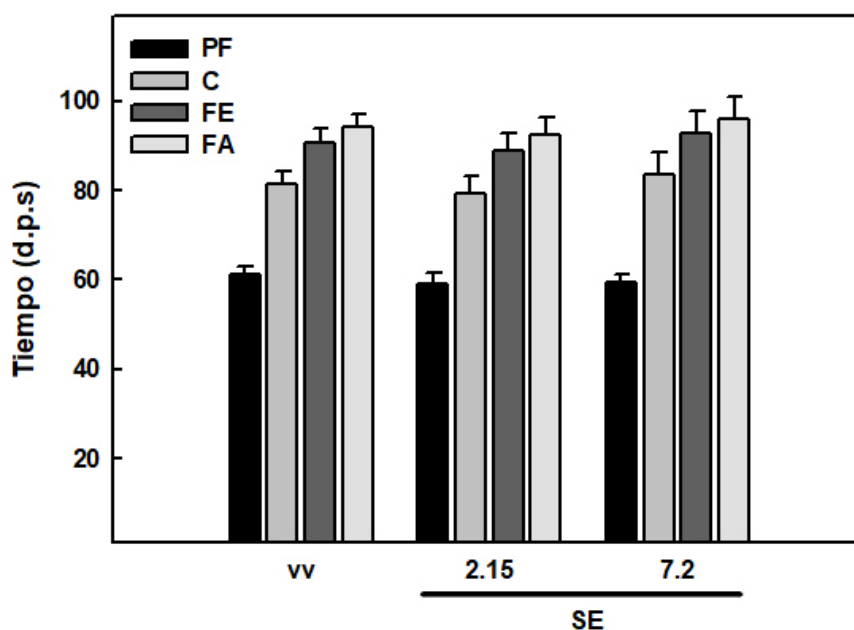
No se detectaron diferencias entre las líneas en el crecimiento del tallo durante la etapa vegetativa (Fig. IV.14), ni tampoco en el desarrollo floral de las plantas (Fig. IV.15), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Fernández-Pérez *et al.* (2014). En este trabajo, los mutantes de inserción para el gen *AtPrx52*, que codifica una peroxidasa de clase III homóloga a *ZePrx*, mostraron un descenso en el ratio S/G sin que esto influyese en su crecimiento vegetativo ni en su desarrollo floral. En mutantes de *A. thaliana* que no expresan *AtPrx2*, *AtPrx25* y *AtPrx71*, con un ratio S/G mayor que las plantas silvestres tampoco se detectaron diferencias en la longitud o ramificación del tallo, aunque sí que se detectó un descenso en el peso de los tallos (Shigeto *et al.* 2015). En cambio, la interrupción de los genes *AtPrx4* y *AtPrx72*, también homólogos de *ZePrx*, provocó una reducción del área foliar y de la longitud del tallo floral de *A. thaliana* (Fernández-Pérez *et al.* 2015; Herrero *et al.* 2013). Por lo tanto, los resultados



**Figura IV.14. Longitud del tallo.** Evolución a lo largo del tiempo de la longitud del tallo de las diferentes líneas. Se muestra la longitud del tallo desde 30 d.p.s (días post siembra) hasta el momento de la floración de las primeras plantas. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar.  $n(\text{vv}) = 39$ ,  $n(\text{SE 2.15}) = 21$  y  $n(\text{SE 7.2}) = 18$ . Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

de este trabajo y su comparación con los de trabajos previos (Fernández-Pérez *et al.* 2014, 2015; Herrero *et al.* 2013; Shigeto *et al.* 2015) apuntan a que distintas isoformas pueden influir o no el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Esta ausencia de diferencias en el desarrollo concuerda con los resultados obtenidos para la actividad peroxidasa frente al alcohol coniferílico y para la detección histoquímica de la actividad peroxidasa, en las que no se pudieron detectar diferencias entre las líneas.



**Figura IV.15. Desarrollo floral.** Se muestra el tiempo que empleó cada línea en alcanzar las diferentes etapas de desarrollo foral descritas en la Fig. III.5. PF: Pre-floración. C: Capullo. FE: Flores emergentes. FA: Flor abierta. d.p.s: días post siembra. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar.  $n(\text{vv}) = 39$ ,  $n(\text{SE 2.15}) = 21$  y  $n(\text{SE 7.2}) = 18$ . Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

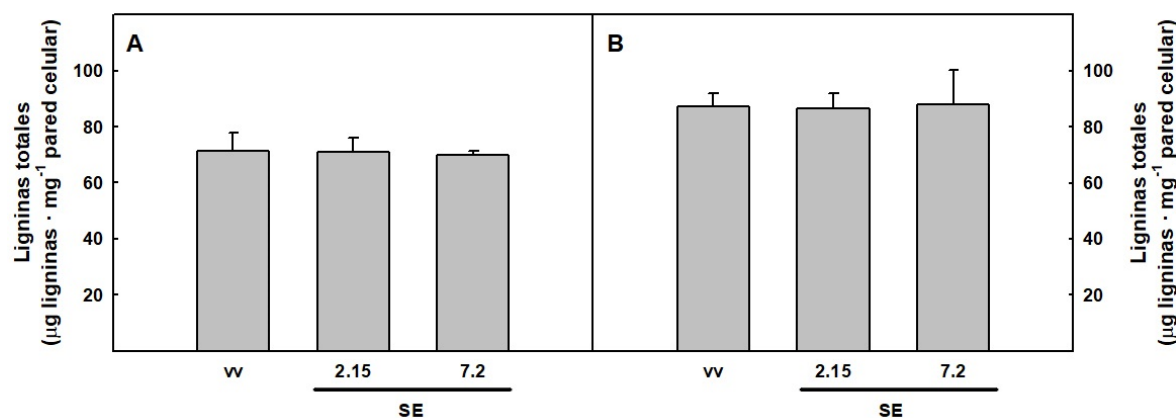
## 5. Caracterización de las paredes celulares

Una vez que se caracterizaron la actividad peroxidasa y el desarrollo en las plantas transformadas y observando que sólo se detectaron cambios en la actividad de las líneas de sobreexpresión SE 2.15 y SE 7.2 se pasó a estudiar en estas líneas y en dos líneas de vector vacío (vv 10.3 y vv 15.14) los posibles efectos de esta alteración sobre las paredes celulares.

### 5.1. Cuantificación de ligninas por el método del bromuro de acetilo

En primer lugar, se determinó la cantidad de ligninas presentes en las paredes celulares. Estos análisis se llevaron a cabo en tallos de plantas de 6 y 8 semanas, empleando las paredes que se purificaron a partir del precipitado obtenido tras extraer las muestras de proteínas simplásticas, que se emplearon para determinar la actividad peroxidasa.

No se detectaron diferencias significativas entre las líneas en la cantidad de ligninas totales determinadas mediante la técnica del bromuro de acetilo (Fig. IV.16). Estos resultados concuerdan con la ausencia de diferencias significativas en la actividad peroxidasa medida con los alcoholes cinamílicos en muestras de proteínas apoplásticas solubles e iónicamente ligadas a la pared (Figs. IV.7 y IV.9). Sin embargo, contrastan con los de otros estudios en los que la sobreexpresión de una peroxidasa de clase III dio lugar a un aumento de las ligninas totales (Cosio *et al.* 2017; El Mansouri *et al.* 1999; Kim *et al.* 2008; Wu *et al.* 2017). Sin embargo, en estos trabajos no se determinó la actividad peroxidasa empleando monolignoles como sustratos. Por otro lado, en los trabajos de Elfstrand *et al.* (2001, 2002), en los que se detectó un aumento de la actividad peroxidasa frente a ABTS y de la tinción con guaiacol, no se detectaron cambios en las ligninas totales. De la misma manera, en este caso, los cambios en la actividad peroxidasa frente a 4MN y siringaldazina no tuvieron como consecuencia un aumento del contenido en ligninas de la pared. Por lo tanto, podemos concluir que la actividad peroxidasa frente a sustratos diferentes de los monolignoles no siempre puede predecir los cambios en el contenido en ligninas totales.



**Figura IV.16. Ligninas totales.** Se determinó el contenido en ligninas de las paredes celulares de los tallos de *N. tabacum* empleando la técnica del bromuro de acetilo. A. Paredes de tallos de 6 semanas.

B. Paredes de tallos de 8 semanas. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media del contenido en ligninas de las paredes  $\pm$  error estándar.  $n(\text{línea}) = 3$ . Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

## 5.2. Caracterización de ligninas mediante tioacidolisis

Aunque no se detectaron diferencias significativas de la actividad frente a monolignoles en el apoplasto en ninguna de las líneas de sobreexpresión (Figs. IV.7-10), la línea SE 7.2 sí que mostró un incremento significativo del ratio S/G en la actividad peroxidasa tanto en las muestras apoplásticas como simplásticas de los tallos de 6 semanas; y tanto esta como la línea SE 2.15 presentaron un aumento significativo de este ratio en las muestras de 8 semanas (Fig. IV.11).

La modificación de la expresión de isoformas de peroxidasa con distinta especificidad de sustrato ha sido propuesta como una posible vía para alterar las propiedades de las ligninas (Vanholme *et al.* 2010). En concreto, el ratio S/G, que se puede modificar siguiendo esta estrategia (Fernández-Pérez *et al.* 2014, 2015; Herrero *et al.* 2013), tiene una gran importancia para determinar las propiedades de las ligninas. Debido a que las unidades S participan, principalmente, en la formación de enlaces  $\beta$ -O-4 al presentar su carbono 5 hidroximetilado, las ligninas con una alta proporción de unidades S son más lineales y presentan un grado de polimerización menor (Stewart *et al.* 2009). Por ello, un ratio S/G alto es una característica deseable en las ligninas para diferentes usos industriales como la obtención de bioetanol, ya que facilita la degradación enzimática de los polisacáridos aumentando la eficiencia de la obtención de azúcares fermentables (Mottiar *et al.* 2016).

Por todo esto, se estudió la composición de las mismas mediante tioacidolisis. Con esta técnica se consigue la degradación de las ligninas presentes en las paredes celulares mediante una solvólisis en medio ácido con los reactivos etanotiol y BF<sub>3</sub> eterato. En estas condiciones se rompen los enlaces  $\beta$ -O-4 y se generan derivados tioetilados a partir de las unidades de las ligninas (Rolando *et al.* 1992), que pueden analizarse mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. De esta manera, y empleando tetracosano como estándar interno, se cuantificaron los derivados del alcohol coniferílico, el coniferilaldehído, alcohol sináplico y sinapilaldehído en las ligninas de los tallos de plantas de 6 y 8 semanas.

Como cabe esperar en una angiosperma (Boerjan *et al.* 2003), las ligninas de los tallos de *N. tabacum* presentaron cantidades similares de derivados del alcohol coniferílico y del sináplico, siendo estos los principales productos de tioacidolisis, y menores cantidades de coniferaldehído y sinapilaldehído. No se encontraron



diferencias significativas en las cantidades de estos cuatro compuestos en las ligninas tanto a 6 como a 8 semanas (Tablas IV.1-2). Estos resultados concuerdan con la cuantificación de ligninas totales con bromuro de acetilo (Fig. IV.16), que revelaron que el contenido en ligninas no se ve afectado por la sobreexpresión de *ZePrx*, ya que no hay un aumento de la actividad peroxidasa apoplástica frente a los monolignoles.

**Tabla IV.1. Monómeros de las ligninas de los tallos de plantas de 6 semanas.** Valores correspondientes a la cuantificación de alcohol coniferílico (conOH), coniferilaldehído (conHO), alcohol sinapílico (sinOH) y sinapilaldehído (sinHO) mediante tioacidolisis. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

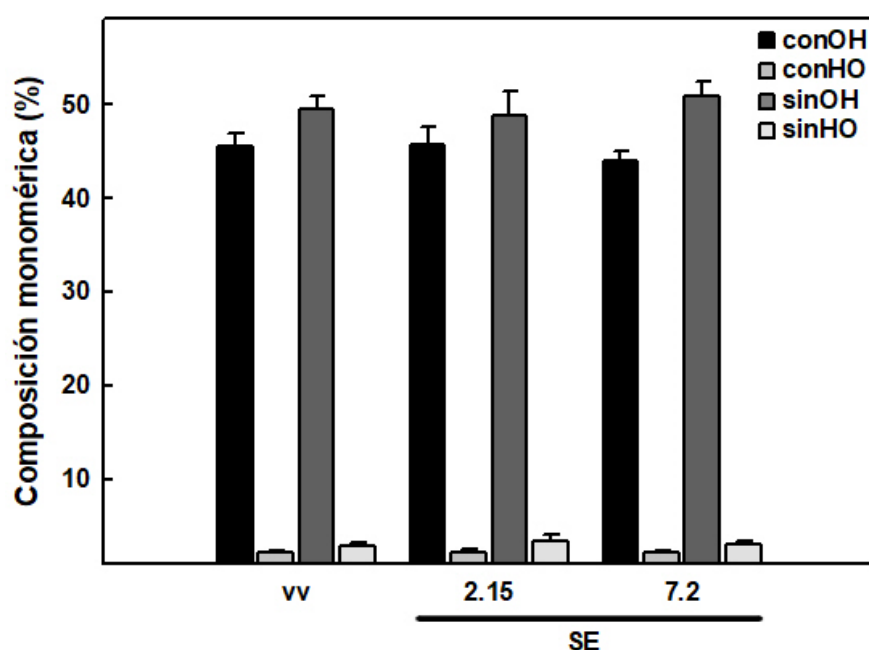
Monómero ( $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ pared celular)				
Línea	conOH	conHO	sinOH	sinHO
vv	17,11 $\pm$ 1,66	0,76 $\pm$ 0,05	18,95 $\pm$ 2,18	1,08 $\pm$ 0,10
SE 2.15	17,30 $\pm$ 3,73	0,80 $\pm$ 0,13	19,33 $\pm$ 5,76	1,16 $\pm$ 0,18
SE 7.2	16,46 $\pm$ 0,43	0,77 $\pm$ 0,07	19,14 $\pm$ 1,34	1,15 $\pm$ 0,04

A continuación, se calculó el porcentaje de cada uno de los monómeros en las ligninas de los tallos de *N. tabacum*. Las ligninas de los tallos de las plantas de 6 semanas no mostraron cambios significativos (Fig. IV.17). En cambio, a las 8 semanas se observó un aumento en torno a un 3% en los monómeros derivados del alcohol sinapílico y un descenso similar del alcohol coniferílico en la línea SE 7.2 (Fig. IV.18), lo que tiene como consecuencia un aumento del ratio S/G (Fig. IV.19). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el ratio S/G de actividad peroxidasa en el apoplasto (Fig. IV.11). Por ello, podemos deducir que el aumento en la proporción de enzimas capaces de oxidar el alcohol sinapílico favorece la incorporación del mismo a las ligninas. Estos resultados concuerdan con la reducción observada en el ratio S/G de las ligninas en plantas mutantes de *A. thaliana* en las que se anuló, mediante inserciones de T-DNA, la expresión de dos genes (*AtPrx4* y *AtPrx52*) que codifican para peroxidasas básicas con una alta homología con *ZePrx* (Fernández-Pérez *et al.* 2014, 2015; Herrero *et al.* 2013). Se confirma así la posibilidad de alterar la composición de las ligninas a través de modificaciones en las isoenzimas de peroxidasa expresadas por la planta.

**Tabla IV.2. Monómeros de las ligninas de los tallos de plantas de 8 semanas.** Valores correspondientes a la cuantificación de alcohol coniferílico (conOH), coniferilaldehído (conHO), alcohol sinápico (sinOH) y sinapilaldehído (sinHO) mediante tioacidolisis. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

<b>Monómero (<math>\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}</math> pared celular)</b>				
<b>Línea</b>	<b>conOH</b>	<b>conHO</b>	<b>sinOH</b>	<b>sinHO</b>
<b>vv</b>	28,02 $\pm$ 2,29	1,01 $\pm$ 0,08	35,36 $\pm$ 2,60	1,59 $\pm$ 0,15
<b>SE 2.15</b>	22,60 $\pm$ 0,79	0,83 $\pm$ 0,02	28,91 $\pm$ 0,52	1,33 $\pm$ 0,08
<b>SE 7.2</b>	23,87 $\pm$ 3,82	0,87 $\pm$ 0,10	33,82 $\pm$ 5,19	1,35 $\pm$ 0,19

El cambio que mostró el ratio S/G de las ligninas de los tallos a 8 semanas (de 1,28 en las líneas transformadas con el vector vacío a 1,43 en la línea SE 7.2) (Fig. IV.19) es mucho menor que el que presentó el ratio S/G de actividad peroxidasa en el apoplasto de los mismos tallos (de 0,89 en las líneas transformadas con el vector vacío a 1,63 en la línea SE 7.2) (Fig. IV.11). Concretamente, un 12% de incremento en el ratio S/G frente a un 83% en la actividad peroxidasa. Esta diferencia es totalmente coherente con el hecho de que las peroxidasas catalizan la última reacción de la ruta de biosíntesis de las ligninas (Vanholme *et al.* 2010), por lo que su actividad está limitada por el suministro de monolignoles debido a la acción de las enzimas previas. El estudio de la ruta de los monolignoles ha puesto de manifiesto que la célula no acumula los intermediarios de la ruta en grandes cantidades (Anterola *et al.* 1999), sino que las enzimas presentan  $k_M$  similares que contribuyen a la coordinación de toda la ruta (Ros Barceló *et al.* 2004). En concreto, en el caso de los monolignoles, el estudio de sus mecanismos de transporte apunta a que no se acumulan en grandes cantidades en la célula, sino que son sintetizados y transportados rápidamente a la pared para ser incorporados a las ligninas (Smith *et al.* 2013). Es decir, la célula no cuenta con un reservorio de monolignoles esperando a ser polimerizados y cuya incorporación vaya a depender en gran medida de las enzimas disponibles para su oxidación, sino que la disponibilidad de los distintos monolignoles es un factor limitante de por sí. Por lo tanto, la modificación de la actividad peroxidasa, sin un exceso de monolignoles sobre

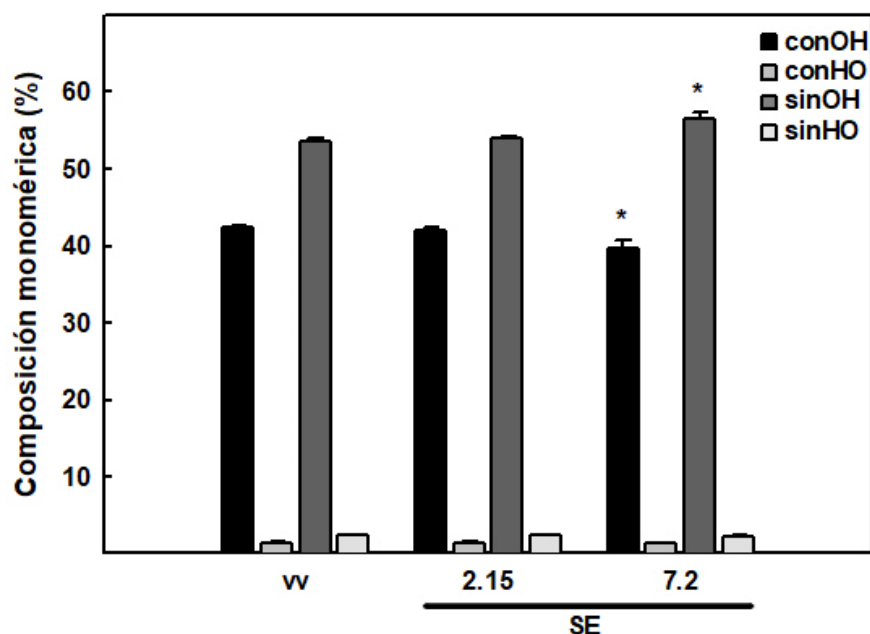


**Figura IV.17. Composición monomérica de las ligninas de los tallos de 6 semanas.** Contribución porcentual de cada monómero al total determinado mediante tioacidólisis. conOH: alcohol coniferílico. conHO: coniferilaldehído. sinOH: alcohol sinapílico. sinHO: sinapilaldehído. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media del contenido de cada monómero en las paredes celulares  $\pm$  error estándar.  $n(\text{línea}) = 3$ . Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

el que actuar, tiene limitado su efecto sobre la biosíntesis de ligninas. No obstante, como ponen de manifiesto los resultados de este trabajo y de trabajos previos (Fernández-Pérez *et al.* 2014, 2015; Herrero *et al.* 2013), las isoenzimas de peroxidasa también son un punto sobre el que actuar para modificar la composición de las ligninas.

Esta limitación en el posible efecto de las peroxidosas sobre la composición de las ligninas debido a su posición en la ruta también podría explicar por qué en los tallos de las plantas de 6 semanas de la línea SE 7.2, aunque su ratio S/G de actividad peroxidasa resultó mayor también en el apoplasto, no se detectaron diferencias significativas en el ratio S/G de las ligninas. Si los diferentes monolignoles se producen en la misma proporción, el efecto que pueden causar las peroxidosas sobre la composición de las ligninas es relativamente pequeño, al verse limitada la cantidad de alcohol sinapílico que pueden oxidar. No obstante, un aumento sostenido de la eficiencia con la que se incorpora el alcohol sinapílico a las ligninas podría llevar a que, como en este caso, en plantas de mayor edad se acabe modificando el ratio S/G de las

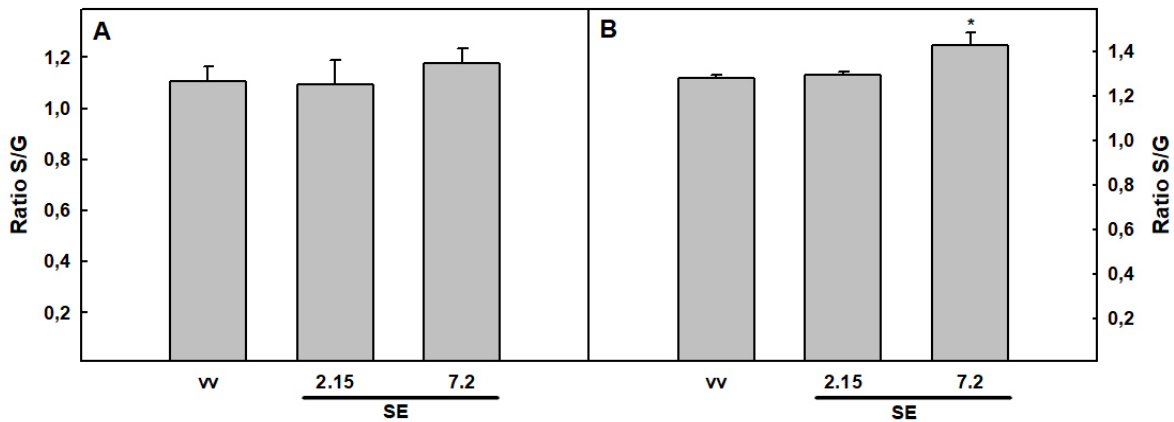
ligninas por acumulación de pequeñas diferencias durante el desarrollo de la planta. De acuerdo con esto, en la línea SE 2.15, en la que solo se detectó un incremento significativo del ratio S/G de la actividad peroxidasa a las 8 semanas (Fig. IV.11) y de menor magnitud que en la línea SE 7.2, no se encontraron diferencias significativas en el ratio S/G de sus ligninas (Fig. IV.19).



**Figura IV.18. Composición monomérica de las ligninas de los tallos de 8 semanas.** Contribución porcentual de cada monómero al total determinado mediante tioacidólisis. conOH: alcohol coniferílico. conHO: coniferilaldehído. sinOH: alcohol sinapílico. sinHO: sinapilaldehído. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media del contenido de cada monómero en las paredes celulares  $\pm$  error estándar.  $n(\text{línea}) = 3$ . Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

Aunque el cambio observado en el ratio S/G de las ligninas de la línea SE 7.2 es pequeño, es interesante destacar que tuvo lugar sin cambios en el crecimiento de las plantas (Figs. IV.14-15). Este cambio en la composición de las ligninas podría mejorar el rendimiento de esta línea para la obtención de azúcares fermentables a partir de su pared (Mottiar *et al.* 2016). Por lo tanto, el hecho de que no esté provocando cambios en el crecimiento es relevante porque, a menudo, esto supone un problema cuando se

altera el contenido o la composición de las ligninas en los vegetales (Bonawitz & Chapple 2013).

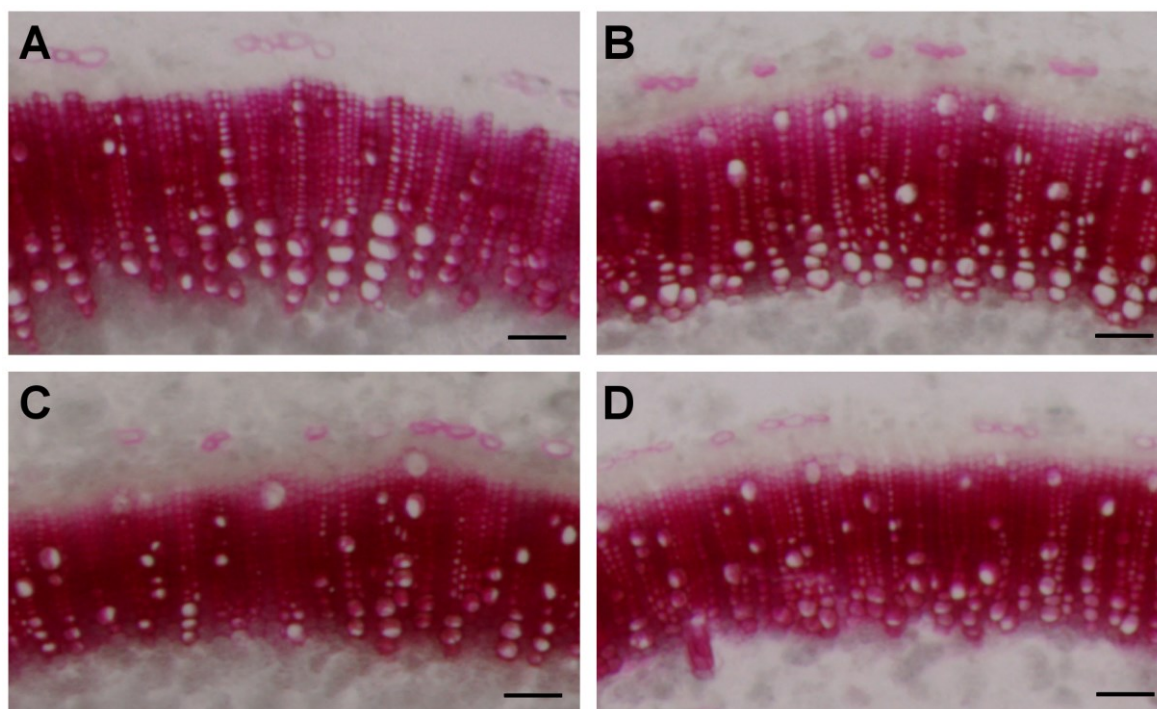


**Figura IV.19. Ratio S/G de las ligninas.** Para cada muestra se calculó el ratio entre unidades de las ligninas de tipo S (alcohol sinapílico y sinapilaldehído) y de tipo G (alcohol coniferílico y coniferilaldehído). A. Paredes de tallos de 6 semanas. B. Paredes de tallos de 8 semanas. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media del ratio  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

### 5.3. Detección histoquímica de las ligninas

Para complementar la información sobre el contenido en ligninas de los tallos obtenida mediante el método del bromuro de acetilo y la tioacidólisis, se empleó la tinción con floroglucinol (reacción de Wiesner) para detectar los grupos *O*-4-hidroxicinamil aldehído terminales de las ligninas de los tallos de plantas de 8 semanas (Pomar *et al.* 2002) y la tinción de Mäule que permite estudiar la distribución de los grupos G y S de las mismas (Strivastava 1966).

En el trabajo de Elfstrand *et al.* (2002), a pesar de no detectarse un incremento de las ligninas totales como respuesta a la sobreexpresión de una peroxidasa, sí que se observó un aumento de la tinción con floroglucinol que se correspondía con un aumento en la incorporación a las ligninas de grupos coniferaldehído. Sin embargo, en nuestro trabajo no se detectaron diferencias entre las líneas mediante la reacción de Wiesner (Fig. IV.20), ni en cuanto a la intensidad de la coloración, ni en cuanto a la distribución de la misma en el tallo. Estos resultados corroboran los obtenidos mediante tioacidólisis (Tablas IV.1-2), en los que no se detectaron diferencias



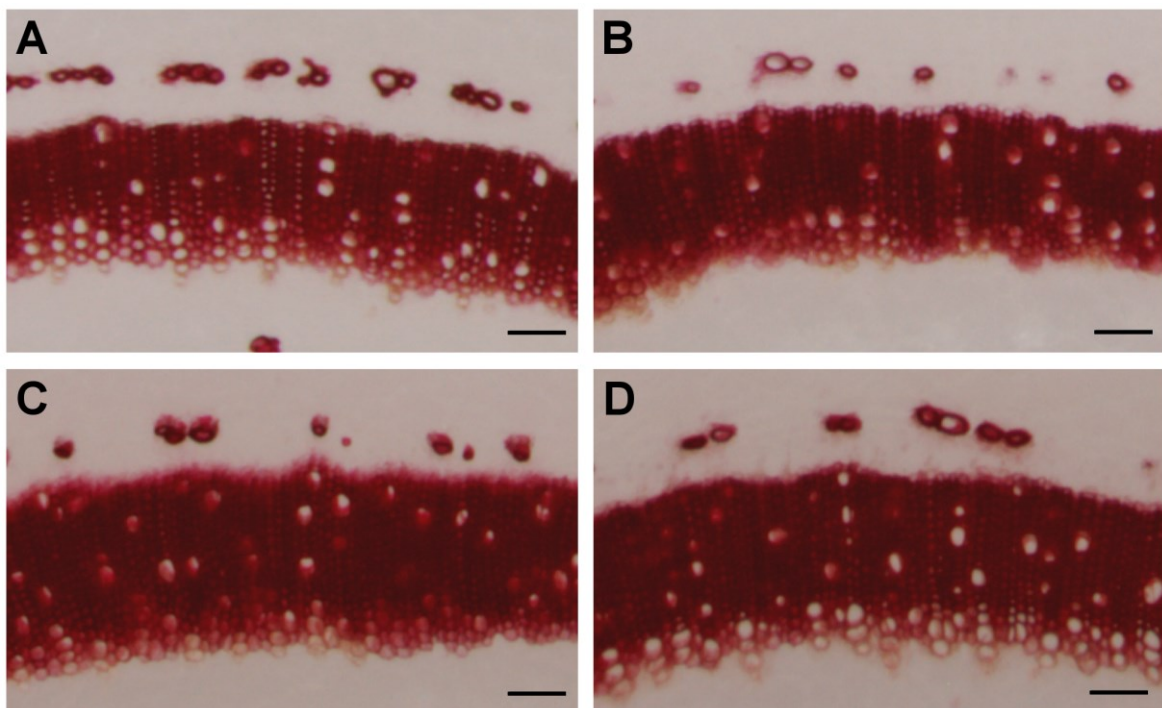
**Figura IV.20. Detección histoquímica de ligninas mediante la tinción de Wiesner.** Detección de los grupos cinamaldehído de las ligninas en secciones transversales de tallos de 8 semanas de *N. tabacum* empleando floroglucinol. A. vv 10.3. B. vv 15.14. C. SE 2.15. D. SE 7.2. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión. La barra horizontal se corresponde con 125  $\mu$ m.

significativas en el contenido de coniferaldehído y sinapaldehído. Tampoco se detectaron cambios en la estructura del tejido del tallo como consecuencia de la expresión de *ZePrx*.

En cuanto a la tinción de Mäule, no se observaron diferencias con respecto a las líneas de vector vacío (Fig. IV.21), a pesar de que sí se observó un aumento del ratio S/G de las ligninas de los tallos de las plantas de 8 semanas mediante tioacidolisis en la línea SE 7.2 (Fig. IV.19). En otros estudios, en cambio, han sido capaces de corroborar el cambio en el ratio S/G mediante esta tinción (Fernández-Pérez *et al.* 2015). Sin embargo, en el trabajo de Fernández-Pérez *et al.* (2015) la diferencia observada en el ratio S/G era mayor (un descenso de un 0,65 a un 0,48, un 26%) que el detectado en nuestro caso (un aumento desde 1,28 a 1,43, un 12%). Por lo que, probablemente, la aparente discrepancia en los resultados de la tioacidolisis y la tinción de Mäule se deba a que el aumento en el contenido de unidades S (Fig. IV.18) es demasiado pequeño como para apreciarse a través de la histoquímica. Además, en el trabajo de Fernández-

Pérez *et al.* (2015) se empleó como especie modelo *A. thaliana*, en cuyo tallo hay una separación clara entre haces vasculares, ricos en ligninas de tipo G, y fibras interfasciculares, ricas en ligninas de tipo S, lo que hace más sencilla la detección de diferencias mediante una tinción histoquímica que en *N. tabacum*, donde los dos tipos celulares no muestran una separación tan clara.

Los resultados de las tinciones histoquímicas vienen a confirmar el impacto limitado de la expresión de *ZePrx* sobre la lignificación y el desarrollo de la pared secundaria en tejidos del tallo, ya que no se observa ni una mayor acumulación de ligninas ni modificaciones de la histología de los tallos.



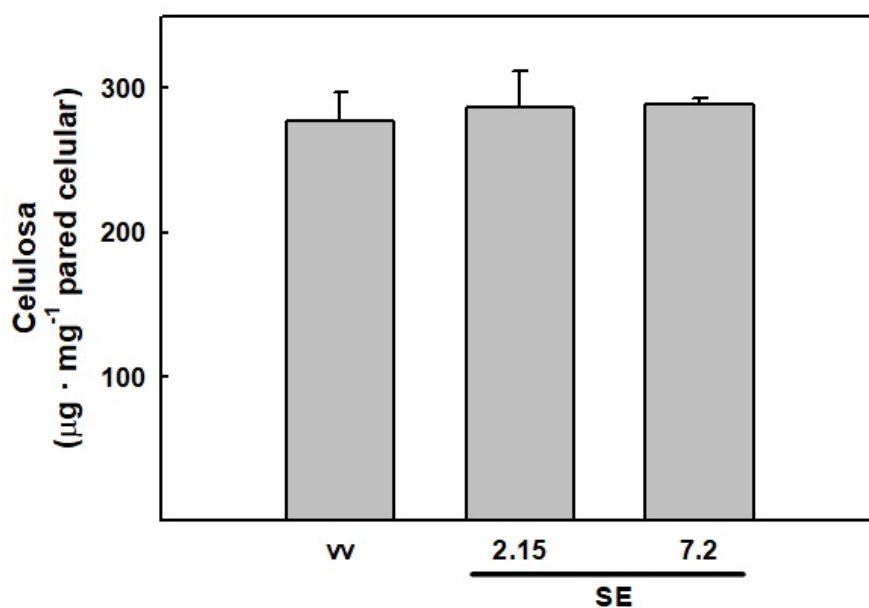
**Figura IV.21. Detección histoquímica de ligninas tipo-S mediante la tinción de Mäule.** Detección de los grupos siringilo de las ligninas en secciones transversales de tallos de 8 semanas de *N. tabacum* empleando  $\text{KMnO}_4$ . A. vv 10.3. B. vv 15.14. C. SE 2.15. D. SE 7.2. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión. La barra horizontal se corresponde con 125  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4. Análisis de la composición de polisacáridos de pared

Debido a la estrecha relación entre los componentes de la pared celular, las modificaciones en la composición y propiedades de uno de ellos, como en este caso la composición de las ligninas, pueden ser compensadas por cambios en otro de los componentes para mantener las propiedades de la pared (Mélida *et al.* 2015; Li *et al.*

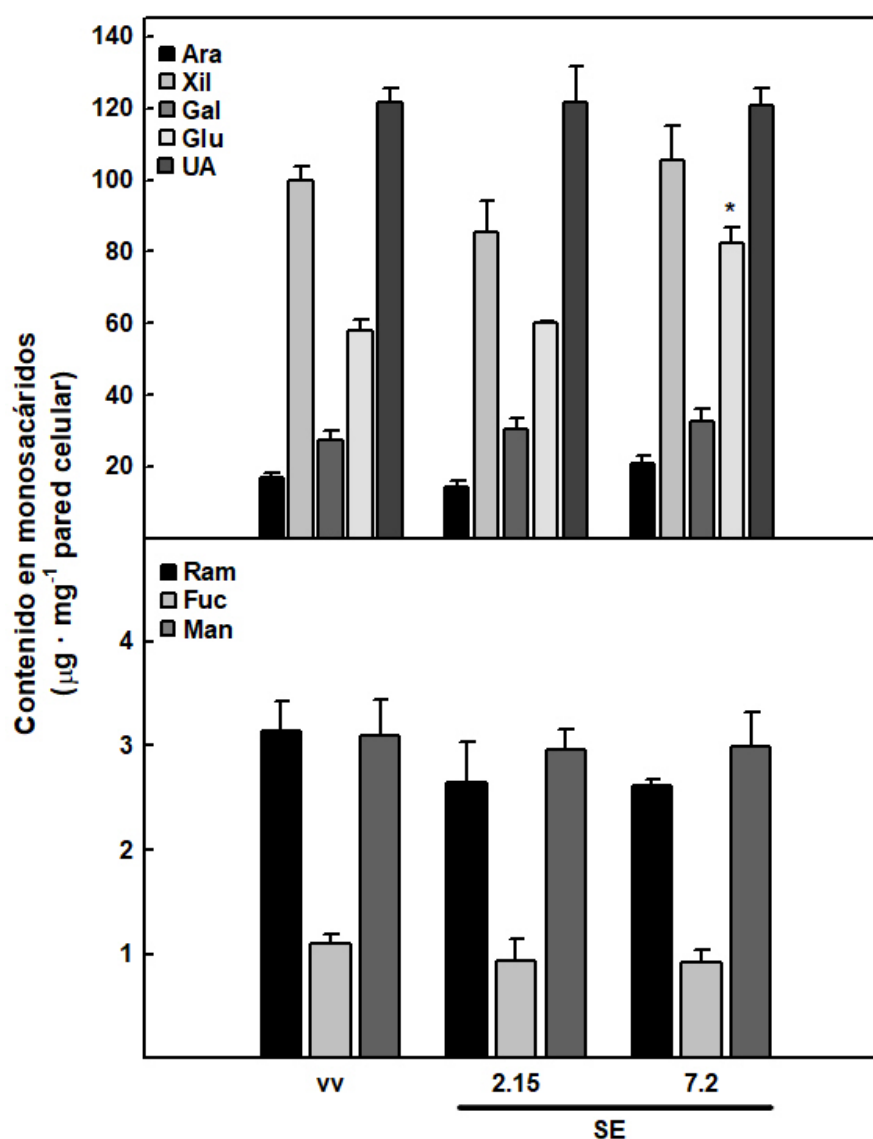
2003b). Por ello, y tras observar que la sobreexpresión de *ZePrx* en *N. tabacum* tiene un mayor efecto sobre las ligninas de las plantas de 8 semanas, se estudió la composición de los polisacáridos de pared en las paredes de estas plantas.

La cuantificación de celulosa mostró que todas las líneas presentaron en torno a un 30% de celulosa cristalina en sus paredes y no permitió detectar diferencias significativas entre las líneas (Fig. IV.22). Por otro lado, el análisis del perfil de monosacáridos de la pared reveló que los azúcares más abundantes en la pared fueron la xilosa y los ácidos urónicos. Esto sugiere una mayor representación en el tallo de paredes ricas en glucurunoxilano, el glucano de entrecruzamiento típico de las paredes secundarias de angiospermas dicotiledóneas, que está formado, fundamentalmente por xilosa y ácido glucurónico (Ebringerová & Heinze 2000). Al igual que para la celulosa, no se detectaron diferencias entre las líneas para la mayoría de los monosacáridos, a excepción de la glucosa, para la que se observó un aumento del 42% en la pared vegetal de las plantas de la línea SE 7.2 (Fig. IV.23). Esto sugiere, que al igual



**Figura IV.22. Contenido en celulosa de las paredes.** Se determinó el contenido en celulosa de las paredes de los tallos de plantas de 8 semanas de *N. tabacum*. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media del contenido en celulosa de las paredes celulares  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).





**Figura IV.23. Contenido en monosacáridos y ácidos urónicos de las paredes.** Se determinó el contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos de las paredes de los tallos de plantas de 8 semanas de *N. tabacum*. Ara: arabinosa. Xil: xilosa. Gal: galactosa. Glu: glucosa. AU: ácidos urónicos. Ram: ramnosa. Fuc: fucosa. Man: manosa. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media del contenido en cada compuesto de las paredes celulares  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

que en el caso de las ligninas, el impacto de la sobreexpresión de *ZePrx* sobre la fracción polisacáridica de la pared vegetal no es muy pronunciado.

La glucosa está presente en la pared celular como parte de la celulosa y en otros polisacáridos de tipo glucano (McNamara *et al.* 2015; Fry 2003). Durante la extracción

con TFA, la técnica empleada para obtener los monosacáridos de la pared, se libera la glucosa procedente de formas no cristalinas de celulosa y del xiloglucano (Foster *et al.* 2010), por lo que un aumento en el contenido de la glucosa sugiere un incremento en el contenido de la pared de uno de estos polisacáridos o de ambos. Por lo tanto, aunque no se observaron diferencias en el contenido en celulosa entre las líneas (Fig. IV.22), este aumento podría deberse a un cambio en la deposición de la celulosa que tenga como consecuencia un incremento en la proporción de celulosa no-cristalina.

Es de especial relevancia que la línea SE 7.2, que presenta un aumento del ratio S/G de las ligninas (Fig. IV.19), presente también un aumento del contenido en glucosa en polisacáridos no-cristalinos de sus paredes celulares (Fig. IV.23), ya que ambas modificaciones tienen un posible interés en la obtención de monosacáridos fermentables. Por un lado, un mayor contenido en azúcares de la pared es deseable, ya que es el producto a obtener. Además, la fracción de polisacáridos no-cristalinos (tanto celulosa amorfa como xiloglucano lo son) es más fácilmente accesible a las enzimas que se usan durante los procesos de sacarificación (Zhao *et al.* 2012). Por otro lado, las paredes con más ligninas de tipo S, gracias a que presentan una mayor proporción de enlaces  $\beta$ -O-4, presentan mayores rendimientos en la obtención de azúcares fermentables (Yoo *et al.* 2018; Mottiar *et al.* 2016). Además, es especialmente relevante porque se llevó a cabo sin un cambio en el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Figs. IV.14-15), un problema que surge de forma recurrente ante la alteración de las ligninas (Bonawitz & Chapple 2013).

##### 5.5. *Análisis mediante espectroscopía de infrarrojos (FT-IR)*

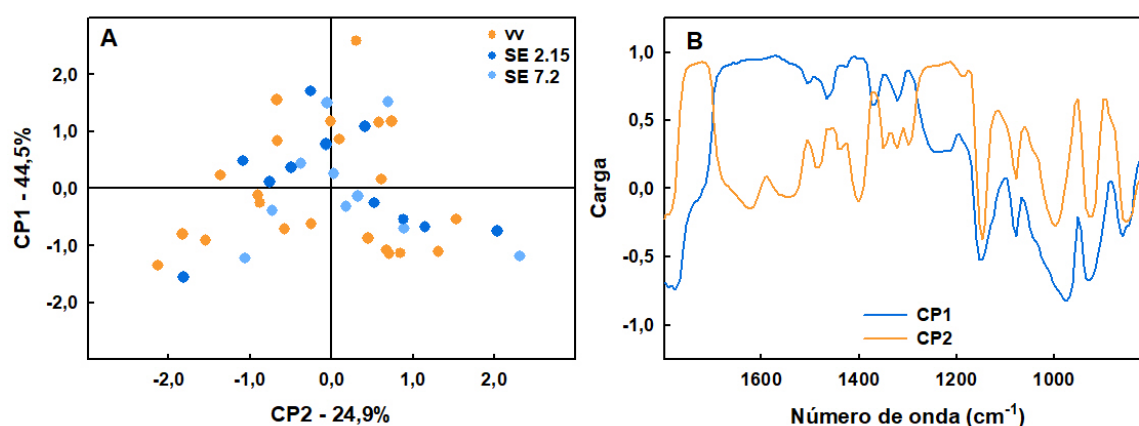
Las técnicas degradativas como la tioacidolisis o las empleadas para el análisis de carbohidratos de pared permiten analizar un componente de la pared celular mediante la degradación del mismo. Por su parte, la espectroscopía de infrarrojos permite estudiar la composición de la pared intacta, por lo que ofrece información sobre todos sus componentes y las relaciones estructurales entre los mismos (Jarvis & McCann 2000). Esta técnica consiste en registrar las perturbaciones en un haz de luz infrarroja (IR) tras su interacción con la muestra de paredes celulares. El interferograma (intensidad a lo largo del tiempo) obtenido es convertido mediante una transformada de Fourier (FT) a un espectro (intensidad para cada número de onda).

Los cambios en la absorbancia de las diferentes frecuencias en este espectro se han ido relacionando con cambios en el contenido de las paredes en distintos componentes (Chen *et al.* 1998; Szymanska-Cargot & Zdunek 2013; Türker-Kaya & Huck 2017; Zhou *et al.* 2011).

Por ello, para obtener una información más completa de la composición de la pared en las diferentes líneas obtuvimos los espectros FT-IR para las paredes de plantas de 6 y 8 semanas. Tras corregir la línea base y normalizar los espectros, se emplearon los espectros obtenidos para llevar a cabo un análisis de componentes principales. El objetivo de este análisis es resumir la gran cantidad de información que aportan los espectros en un número reducido de variables, de más sencilla interpretación (Chen *et al.* 1998).

Al realizar el análisis de componentes principales seleccionamos, tanto para los datos a 6 como a 8 semanas, 6 factores. En ambos casos con 3 componentes recogimos el 84% de la varianza, pero al incluir 6, conseguimos que ninguna variable inicial tuviese una comunalidad inferior al 50%, asegurándonos así de conservar la mayoría de las posibles fuentes de variabilidad entre las líneas. A continuación, se emplearon las puntuaciones factoriales para representar todas las muestras y estudiar las posibles diferencias entre grupos. Tanto para las plantas de 6 semanas (Fig. IV.24) como para las de 8 (Fig. IV.25), las puntuaciones factoriales no mostraron un agrupamiento claro de las muestras de las diferentes líneas en función de ninguno de los componentes, lo que refleja que las distintas líneas presentan una composición de las paredes celulares similar. Además, con el objetivo de interpretar la información recogida por cada uno de los componentes se representaron las cargas de los mismos frente a los números de onda recogidos en el espectro (Figs. IV.24B y IV.25B). Tanto en las muestras de 6 como en las de 8 semanas, el primer componente, responsable de casi la mitad de la varianza explicada, mostró una correlación positiva con números de onda correspondientes a múltiples componentes de la pared, lo que dificultó la interpretación del mismo.

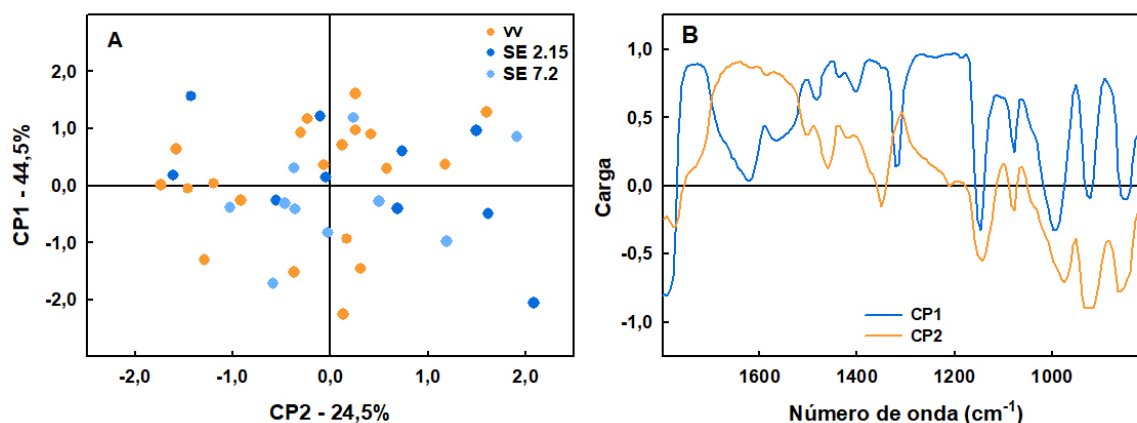
Para determinar la utilidad de los componentes principales para diferenciar las cuatro líneas aplicamos un MANOVA a las puntuaciones factoriales de los 6 primeros componentes principales. Este test no permitió detectar diferencias entre las líneas ( $\alpha = 0,05$ ), lo que concuerda con la información aportada por los análisis de contenido en



**Figura IV.24. ACP de los espectros FT-IR de las paredes de los tallos de plantas de 6 semanas.** Se representan las puntuaciones factoriales de los 2 primeros componentes obtenidos en el análisis de componentes principales con los datos obtenidos mediante espectroscopía FT-IR. En los ejes se indica el porcentaje de varianza explicado por cada uno de los componentes principales (CP). A. CP1 vs. CP2. B. cargas factoriales de los tres componentes. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. n(línea) = 11.

ligninas (Fig. IV.16), composición de las ligninas (Figs. IV.17-19), contenido en celulosa (Fig. IV.22) y monosacáridos de la pared (Fig. IV.23), que no han permitido, en la mayoría de los casos, diferenciar las líneas.

Sin embargo, en el caso de la línea SE 7.2, sí que se detectaron diferencias significativas en las paredes de los tallos de plantas de 8 semanas en el ratio S/G de las ligninas (Fig. IV.19) y la cantidad de glucosa de la pared celular (Fig. IV.23), pero tampoco se pudo diferenciar este grupo en función de sus puntuaciones factoriales en este tiempo (Fig. IV.25). Puede que la pequeña magnitud de los cambios, en el primer caso, y la posible convergencia de varios factores en el segundo (proporción de celulosa cristalina y cantidad de xiloglucano) hayan hecho que no sea posible detectar estas diferencias mediante FT-IR. En el caso del ratio S/G de las ligninas, aunque se ha podido relacionar con las modificaciones en la intensidad de algunas bandas, estas se solapan con las de otros compuestos (Türker-Kaya & Huck 2017; Zhou *et al.* 2011). Por ello, para predecir el ratio S/G de las ligninas mediante FT-IR a menudo se combina la información de esta técnica con la de métodos degradativos. Esto permite construir modelos que, posteriormente, pueden usarse para estimar el ratio S/G a partir de los datos de FT-IR. Sin embargo, dada la variabilidad en la composición de las paredes de



**Figura IV.25. ACP de los espectros FT-IR de las paredes de los tallos de plantas de 8 semanas.** Se representan las puntuaciones factoriales de los 2 primeros componentes obtenidos en el análisis de componentes principales con los datos obtenidos mediante espectroscopía FT-IR. En los ejes se indica el porcentaje de varianza explicado por cada uno de los componentes principales (CP). A. CP1 vs. CP2. B. cargas factoriales de los tres componentes. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión.  $n(\text{línea}) = 10$ .

las diferentes especies estos modelos suelen ser válidos para tipos específicos de muestras, lo que evidencia la complejidad de determinar este parámetro mediante FT-IR (Lupoi *et al.* 2014).

Durante el análisis de componentes principales se pierde parte de la información (recogida en las componentes no seleccionadas). Esto podría explicar que no encontremos diferencias entre las líneas empleando las componentes principales a pesar de que sí se detectaron diferencias por métodos degradativos en el caso del ratio S/G y el contenido en glucosa en las paredes de la línea SE 7.2. Por ello, se empleó un ANOVA funcional (FANOVA) para comparar los espectros íntegros. Este test consiste en un análisis de la varianza que emplea como datos funciones en lugar de valores numéricos únicos. Por lo tanto, permite comparar la totalidad de las curvas obtenidas para las diferentes réplicas sin perder información.

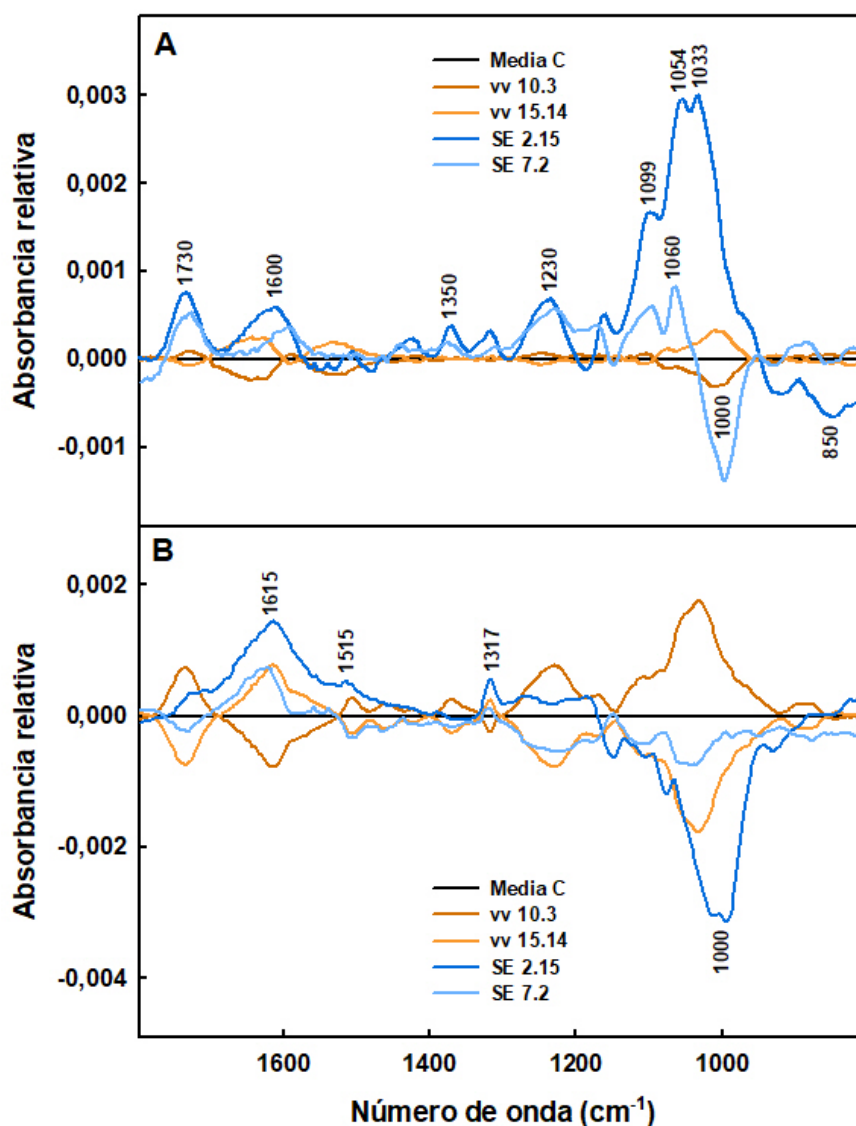
Este test tampoco detectó diferencias significativas entre las diferentes líneas ( $\alpha = 0,05$ ). Al analizar el espectro en subintervalos sí que reveló que algunas regiones presentaron más variabilidad entre las medias de las líneas, pero estas diferencias tampoco resultaron significativas. Para observar más fácilmente estas diferencias se representaron los espectros diferenciales de cada línea. Para ello, se calculó la media de los espectros correspondientes a las líneas de vector vacío. A continuación, esta

media se restó de los espectros de cada una de las líneas. De esta manera se obtuvo una referencia de la oscilación de las cuatro líneas (Fig. IV.26).

En las muestras de 6 semanas (Fig. IV.26A) las absorbancias relativas medias en las líneas de sobreexpresión (SE 2.15 y SE 7.2) fueron superiores a la media de las líneas de vector vacío en torno a 1730, 1600, 1350 y 1230  $\text{cm}^{-1}$ , y en el tramo de 1150 a 1050  $\text{cm}^{-1}$ . En el caso de SE 2.15, las mayores diferencias con respecto a las líneas de vector vacío se registraron entre los 1100 y los 1000 (1033, 1054, 1099)  $\text{cm}^{-1}$ , con un aumento de la intensidad. Además, esta línea también presentó un descenso de la absorbancia relativa con respecto a las demás en torno a los 850  $\text{cm}^{-1}$ . En cambio la línea SE 7.2 mostró un descenso alrededor de los 1000 (999)  $\text{cm}^{-1}$ .

Los cambios en la absorbancia a 1235  $\text{cm}^{-1}$  se han relacionado con la abundancia de grupos siringilo en las ligninas (Zhou *et al.* 2011). El aumento de la absorbancia en esta frecuencia (Fig. IV.26A), aunque no significativo, concuerda con los resultados del análisis de las paredes mediante tioacidolisis. Este análisis mostró que el ratio S/G medio para la línea SE 7.2 fue superior que el de las líneas de vector vacío (Fig. IV.19). Sin embargo, no se observó la misma tendencia en el caso de la línea SE 2.15. No obstante, otros autores han adjudicado los cambios en esta región a la vibración de grupos amida, por lo que cambios en la cantidad de proteínas podrían ser los responsables del aumento medio de la absorbancia en esta región (Türker-Kaya & Huck 2017). Por otro lado, la señal de la región en torno a 1600  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración del anillo aromático de las ligninas (Türker-Kaya & Huck 2017), aumentó su intensidad media para las líneas SE 2.15 y SE 7.2. Aunque esto podría apuntar a un enriquecimiento en ligninas de las paredes de las líneas de sobreexpresión, el FANOVA mostró que estas diferencias no fueron significativas. Además, otras frecuencias relacionadas con el contenido en ligninas, como 1420, 1458 y 1500  $\text{cm}^{-1}$  (McCann *et al.* 1997; Wang *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2011), no mostraron un incremento con respecto a las líneas de vector vacío. Esto concuerda con los datos de cuantificación de ligninas obtenidos mediante la técnica degradativa del bromuro de acetilo, que no permitió detectar diferencias entre las líneas (Fig. IV.16).

Por otro lado, ambas líneas de sobreexpresión SE 2.15 y SE 7.2 mostraron en los tallos de 6 semanas (Fig. IV.26A) un aumento de la absorbancia media a una serie de



**Figura IV.26. Espectros diferenciales FT-IR.** Espectros FT-IR obtenidos tras restar a cada muestra la media de los espectros de las líneas de vector vacío (vv 10.3 y vv 15.14). A. Paredes de tallos de 6 semanas. B. Paredes de tallos de 8 semanas. Media C: media líneas vv. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión. Se representa el valor medio de la diferencia de absorbancia relativa.  $n(A) = 11$ .  $n(B) = 10$ . Los números sobre el espectro indican los números de onda a los que se sitúan los máximos y mínimos en las líneas de sobreexpresión que superan en valor absoluto la media para las líneas de vector vacío. Los análisis estadísticos (FANOVA) no detectaron diferencias significativas entre las líneas ( $\alpha = 0,05$ ).

frecuencias ( $1730$ ,  $1350$  y  $1099$   $\text{cm}^{-1}$ ) relacionadas con diferentes tipos de polisacáridos de pared (celulosa, xilano, arabinogalactano y pectinas) (Chang *et al.* 2014; Szymanska-Cargot & Zdunek 2013; Türker-Kaya & Huck 2017). También a los

polisacáridos se correspondieron las alteraciones más relevantes en los espectros medios. Estas se observaron entre los 1060 y los 1000  $\text{cm}^{-1}$ , dónde las líneas de sobreexpresión mostraron un comportamiento divergente. Esta región ofrece información sobre múltiples polisacáridos presentes en la pared, aunque también recoge información sobre otros componentes de la misma (da Costa *et al.* 2014; Fahey *et al.* 2017; Szymanska-Cargot & Zdunek 2013; Türker-Kaya & Huck 2017; Wang *et al.* 2012). De hecho, la multitud de compuestos que pueden aportar a la señal de estos números de onda complica su interpretación (Wang *et al.* 2012).

Ambas líneas de sobreexpresión mostraron, también, un aumento de la absorbancia media alrededor de los 1060  $\text{cm}^{-1}$  –con máximo en 1054  $\text{cm}^{-1}$  en el caso de SE 2.15 y en 1060  $\text{cm}^{-1}$ , en SE 7.2–, que se relaciona con el contenido en celulosa de la pared (da Costa *et al.* 2014; Salmén & Bergström 2009). Sin embargo, en la región en torno a 1000  $\text{cm}^{-1}$  las dos líneas de sobreexpresión mostraron un comportamiento divergente. Mientras que la línea SE 2.15 mostró un aumento de la absorbancia en la región en torno a 1033  $\text{cm}^{-1}$  del espectro, la línea SE 7.2 presentó una reducción a los 1000  $\text{cm}^{-1}$  con respecto a las líneas de vector vacío. Ambas regiones (1060  $\text{cm}^{-1}$  y 1000  $\text{cm}^{-1}$ ) pueden relacionarse con el contenido en celulosa de las paredes (da Costa *et al.* 2014), aunque hay otros polisacáridos que contribuyen a la señal de esta región (Fahey *et al.* 2017; Szymanska-Cargot & Zdunek 2013; Türker-Kaya & Huck 2017; Wang *et al.* 2012). No obstante, estas oscilaciones son coherentes con la ausencia de diferencias significativas en el FANOVA, sugiriendo que, igual que a las 8 semanas, las muestras de 6 semanas tampoco mostraron diferencias en el contenido en celulosa entre las líneas.

Por otro lado, a las 8 semanas (Fig. IV.26B) solo la línea SE 2.15 mostró diferencias en su absorbancia media con respecto a las líneas de vector vacío, con un incremento de la absorbancia media en torno a los 1615, 1515 y 1317  $\text{cm}^{-1}$  y un descenso de la misma alrededor de los 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Los dos primeros picos, a 1615 y 1515  $\text{cm}^{-1}$ , están relacionados con la presencia de ligninas en la pared (McCann *et al.* 1997; Türker-Kaya & Huck 2017; Wang *et al.* 2012). Esto apunta a un ligero aumento en este parámetro, aunque no significativo, lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante bromuro de acetilo (Fig. IV.16). Por otro lado, tanto la región a 1317  $\text{cm}^{-1}$ , que aumenta, como las frecuencias en torno a 1000  $\text{cm}^{-1}$ , dónde se observa



un descenso de la absorbancia frente al resto de las líneas, se corresponden con señales de la celulosa (Chang *et al.* 2014; da Costa *et al.* 2014; Szymanska-Cargot & Zdunek 2013). Es decir, aunque esta región mostró más variabilidad entre las líneas, las diferentes frecuencias del espectro no muestran una tendencia clara en lo que respecta a la fracción de polisacáridos. De hecho, la cuantificación de celulosa (Fig. IV.22) no reveló cambios para la cantidad de este polisacárido en las paredes.

Por lo tanto, los datos de cuantificación y composición de ligninas y polisacáridos y el análisis mediante FT-IR nos indican que la sobreexpresión de *ZePrx* no ejerce un gran impacto sobre la composición de la pared celular. No obstante, la modificación del ratio S/G en la actividad peroxidasa propiciado por la presencia de *ZePrx* ha sido suficiente para alterar el ratio S/G de las ligninas en la línea SE 7.2 y causar un aumento de los polisacáridos no cristalinos en la pared. Dado que esta línea fue la que mostró una mayor modificación de su actividad peroxidasa, los datos apoyan la participación de *ZePrx* en la lignificación de la pared secundaria y apuntan a que, o bien la mayor actividad peroxidasa o bien la modificación de la composición de las ligninas pueden inducir ligeras alteraciones en la pared; pero sin modificar drásticamente la composición de la misma.

### **6. Caracterización del comportamiento mecánico del tallo.**

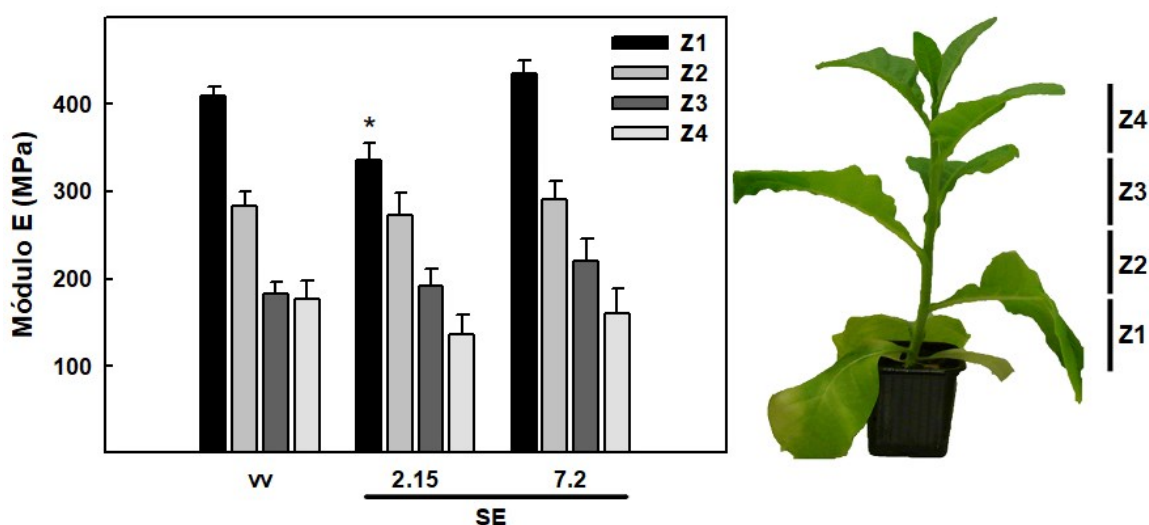
La composición de la pared condiciona las propiedades de la misma, entre ellas su comportamiento mecánico. En la pared secundaria, la sustitución de las pectinas por ligninas y un mayor depósito de celulosa que, además, presenta una disposición más ordenada, aumenta la rigidez de la misma, haciéndola más resistente (Gibson 2012). Viendo los cambios registrados en las paredes celulares de las diferentes líneas, se llevaron a cabo ensayos de tracción para determinar la elasticidad del tallo en plantas de 8 semanas de edad. Este parámetro se emplea a menudo como indicativo de alteraciones de las propiedades de la pared (MacMillan *et al.* 2010).

Para llevar a cabo estos ensayos se dividieron los tallos de plantas de tabaco de 8 semanas en cuatro regiones (basal, medio inferior, medio superior y apical). Cada segmento se sometió a un ensayo de tracción empleando una máquina universal (Instron). Para ello se sujetaron los extremos del segmento de tallo con las mordazas y

se aplicó una fuerza de tensión en la dirección principal del eje del tallo, registrándose simultáneamente la fuerza aplicada (tensión) y la distancia entre las mordazas (deformación). La relación entre estas dos variables constituye el módulo E o módulo de Young, inversamente proporcional a la elasticidad de un material. El ensayo finalizó tras superar el punto de fluencia. En este punto se alcanza el valor máximo de tensión que un material puede soportar sin deformarse de forma irreversible (deformación elástica) y a partir de este punto los materiales pasan a deformarse plásticamente.

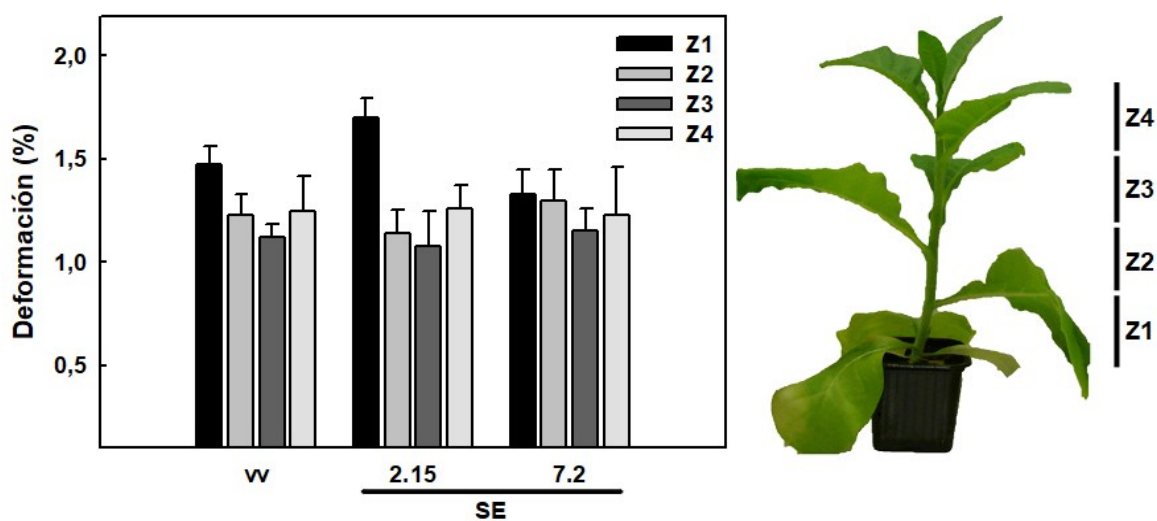
Los tres parámetros registrados (módulo E, deformación y tensión) mostraron en todos los casos sus valores más altos en los segmentos basales de los tallos (Figs. IV.27-29). Esto indica que la parte basal de los tallos es capaz de soportar, por una parte, mayores cargas sin deformarse, es decir, es menos elástica, lo que viene dado por el módulo E (Fig. IV.27). Además, esta región también puede resistir una mayor tensión en el punto de fluencia (Fig. IV.29), lo que indica que es necesario aplicar una fuerza mayor para deformarla de forma irreversible. Estos cambios se deben, previsiblemente, a la evolución de la composición a lo largo del tiempo. A medida que se desarrolla la planta, las partes basales del tallo se engrosan debido a su crecimiento secundario, aumentando la proporción del mismo formado por células del xilema. Estas células desarrollan paredes celulares secundarias, con ligninas y un mayor porcentaje de celulosa. Esta, además, presenta una estructura más ordenada. Por lo que el resultado es un tejido menos flexible, con un mayor módulo E y un aumento de las cargas y deformaciones que es capaz de soportar (Gibson 2012). Estos resultados son coherentes con el aumento del módulo E en función de la edad de las plantas observado en otros trabajos (Zhang *et al.* 2015).

Entre las líneas analizadas solo se detectaron diferencias significativas en el módulo E de los segmentos más basales (Fig. IV.27), siendo este valor menor en el caso de las plantas de la línea SE 2.15. De forma genérica, la reducción del módulo E en los tallos puede achacarse a un empobrecimiento de la pared en celulosa, ya que este es el componente de la pared con una menor elasticidad (Chanliaud *et al.* 2002; Rayón Encinas *et al.* 2013), aunque también hay otros carbohidratos cuya reducción drástica puede causar una reducción en el módulo E (MacMillan *et al.* 2010). Ni los análisis de cuantificación ni de composición de las ligninas y los carbohidratos, ni el FT-IR



**Figura IV.27. Deformación elástica del tallo.** Se muestra el módulo E en distintas regiones del tallo de plantas de 8 semanas para diferentes zonas. Z1: Zona 1 (base). Z2: Zona 2. Z3: Zona 3. Z4: Zona 4 (ápice). vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar.  $n(\text{línea}) = 6$ . Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

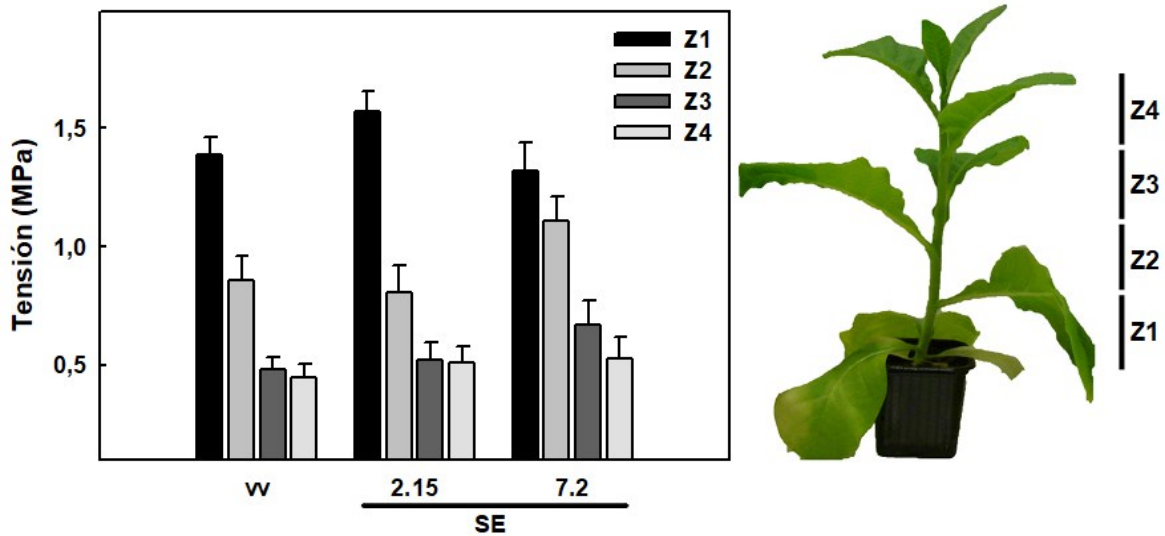
permitieron detectar diferencias significativas en la composición de las paredes de la línea SE 2.15. Sin embargo, esta línea fue la que presentó un espectro FT-IR medio de las paredes de 8 semanas con más diferencias con respecto a las demás, mostrando una reducción de la absorbancia relativa con respecto a las otras líneas en torno a los  $1000 \text{ cm}^{-1}$  (Fig. IV.26B), región relacionada con el contenido en celulosa y otros polisacáridos de la pared (Fahey *et al.* 2017; Szymanska-Cargot & Zdunek 2013; Türker-Kaya & Huck 2017). Aunque estas diferencias no resultaron significativas, las diferencias medias podrían sugerir que la fracción polisacáridica es la responsable de este cambio en el módulo E. Sin embargo, tanto la determinación de celulosa como el análisis de los monosacáridos presentes en la pared no mostraron diferencias significativas para esta línea (Figs. IV.22-23). No obstante, hay que tener en cuenta que estos análisis se llevaron a cabo para el total del tallo, mientras que el análisis de tracción sólo detectó diferencias en la base del mismo. Por lo tanto, no podemos descartar que esta región sea la que muestre un cambio de composición que no sea lo suficientemente grande como para afectar al valor total, pero sí para aumentar la elasticidad del tallo. No obstante, otros factores distintos a la composición de la pared podrían estar detrás del



**Figura IV.28. Deformación máxima en fase elástica.** Se muestra el porcentaje máximo de deformación que pueden alcanzar los tallos de plantas de 8 semanas antes de deformarse de forma irreversible. Z1: Zona 1 (base). Z2: Zona 2. Z3: Zona 3. Z4: Zona 4 (ápice). vv: vector vacío (media 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar.  $n(\text{línea}) = 6$ . Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

cambio en la elasticidad del tejido. Es el caso del contenido en agua de la pared o el ángulo con respecto al eje del tallo en el que se depositan las microfibrillas de celulosa, ambos inversamente relacionados con el módulo de Young (Courchene *et al.* 2006; Kersavage 1973).

Por el contrario, en la línea SE 7.2, en la que se detectó un cambio en el ratio S/G de las ligninas (Fig. IV.19) y en el contenido en glucosa del tallo (Fig. IV.23) no se observaron diferencias en el comportamiento mecánico con respecto a las líneas control (Figs. IV.287-29). Estos resultados pueden explicarse, en el caso de las ligninas, por la pequeña magnitud del cambio en el ratio S/G, que podría no estar teniendo un efecto notable sobre el módulo E. Sin embargo, también es posible que estas dos modificaciones de la pared pueden estar teniendo efectos contrarios sobre la misma y, por lo tanto, compensando sus efectos sobre el módulo E. De hecho, los tejidos con un enriquecimiento en ligninas de tipo S presentan un aumento de su módulo E (Koehler *et al.* 2006) al igual que otras modificaciones que reducen el nivel de entrecruzamiento de las ligninas (Hepworth & Vincent 1998). Por su parte, la presencia de celulosa



**Figura IV.29. Tensión máxima en fase elástica.** Se muestra la tensión máxima que pueden alcanzar los tallos de plantas de 8 semanas antes de deformarse de forma irreversible. Z1: Zona 1 (base). Z2: Zona 2. Z3: Zona 3. Z4: Zona 4 (ápice). vv: vector vacío (media 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar.  $n(\text{línea}) = 6$ . Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

crystalina en la pared también está relacionada positivamente con el módulo E (Placet *et al.* 2012). Estos resultados podrían indicar, por lo tanto, que el cambio en el contenido en glucosa de la pared sea consecuencia de un mecanismo de control que se haya activado como consecuencia del cambio en el ratio S/G de las ligninas para mantener las propiedades de las paredes.

Para los otros dos parámetros estudiados (deformación y tensión máximas en la fase elástica) no se detectaron diferencias significativas entre las líneas. No obstante, en ambos casos el valor medio para la línea SE 2.15 en la zona basal del tallo aumentó con respecto al control (Figs. IV.28-29). El aumento en la deformación máxima (Fig. IV.28), de forma coherente con la disminución del módulo E en esta línea, indica que el tallo de estas plantas, al menos en la región basal, es capaz de soportar deformaciones más grandes sin que estas sean permanentes. Es decir, el tejido es más flexible en esta zona. Por otro lado, la tensión máxima soportada por las plantas de esta línea también es superior de media en los segmentos basales del tallo (Fig. IV.29). Esto indica que es necesaria una fuerza mayor para provocar una deformación irreversible en los tallos de estas plantas. Aparentemente, la reducción del módulo E ha tenido como

consecuencia en estas plantas un cambio en el punto de fluencia, haciéndolas capaces de soportar mayores tensiones, ya que aunque estas generen una mayor deformación en las mismas, estas se producen de forma reversible. No obstante, para confirmar estos resultados sería necesario aumentar el tamaño muestral y verificar que no se deben a una oscilación de la media, dado que no resultaron significativos en este ensayo.

Es relevante el hecho de que los resultados del comportamiento mecánico del tallo muestran una mayor relación con los obtenidos mediante espectroscopía FT-IR que con los de composición de los diferentes componentes de la pared. Esto se debe a que las técnicas no degradativas, como el FT-IR, ofrecen información sobre la cantidad y composición de las distintas macromoléculas pero también sobre la relaciones que se establecen entre las mismas, la cual se pierde con las técnicas degradativas clásicas que se emplean para el análisis de polisacáridos de pared y ligninas (Jarvis & McCann 2000).

En el resto de los segmentos del tallo no se detectaron diferencias significativas entre las líneas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la tioacidolisis, en la que observamos que las diferencias se observaban en los tallos de 8 semanas (Figs. IV.17-18). En ambos casos los resultados apuntan a que las diferencias en la composición de la pared son de pequeña magnitud y se manifiestan en tejidos más desarrollados por un efecto acumulativo.

## **7. Caracterización de los metabolitos y enzimas del ciclo ascorbato-glutatión**

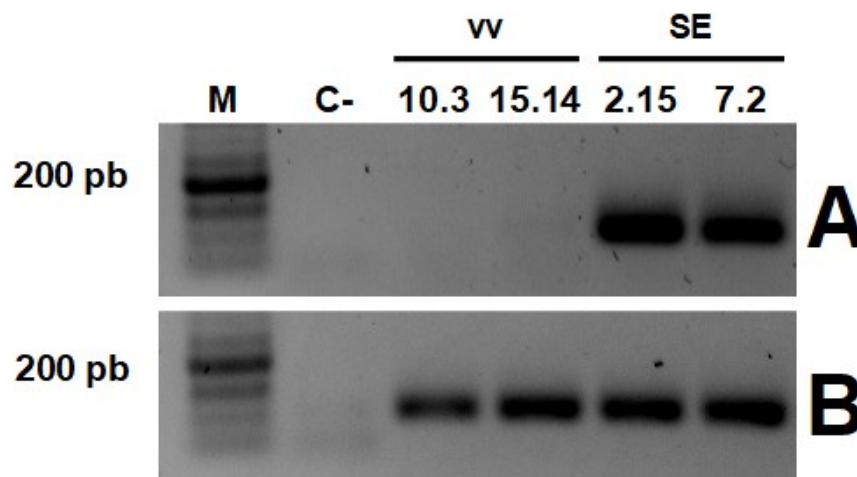
Dado que las peroxidasas de clase III son capaces, a través de sus dos ciclos catalíticos, de consumir o generar ROS, pudiendo modificar el estado redox de los tejidos, se caracterizó el impacto sobre el ciclo del ascorbato-glutatión de la sobreexpresión del gen que codifica ZePrx. Este ciclo constituye uno de los elementos más importantes para controlar la concentración de  $H_2O_2$  en la célula y puede contribuir a transmitir señales sobre el estado redox de la célula (Foyer & Noctor 2011). Consiste en un sistema de cuatro enzimas (ascorbato peroxidasa, dehidroascorbato reductasa, monodehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa) que emplean como sustratos las formas oxidadas y reducidas del ascorbato y glutatión

para eliminar peróxido de hidrógeno a expensas de poder reductor (NADH y NADPH) (De Gara *et al.* 2010). La acción antioxidante de este sistema está complementada por otras enzimas capaces de consumir ROS, como la catalasa, que degrada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Feierabend 2005).

Con el objetivo de caracterizar los cambios en el estado redox inducidos por la sobreexpresión de *ZePrx* se estudió el contenido de las formas reducidas y oxidadas de ascorbato y glutatión, así como la actividad de las enzimas implicadas en el ciclo ascorbato-glutatión. Para ello se emplearon muestras de hoja de plantas de tres semanas de edad.

#### 7.1. Expresión de *ZePrx* en hoja

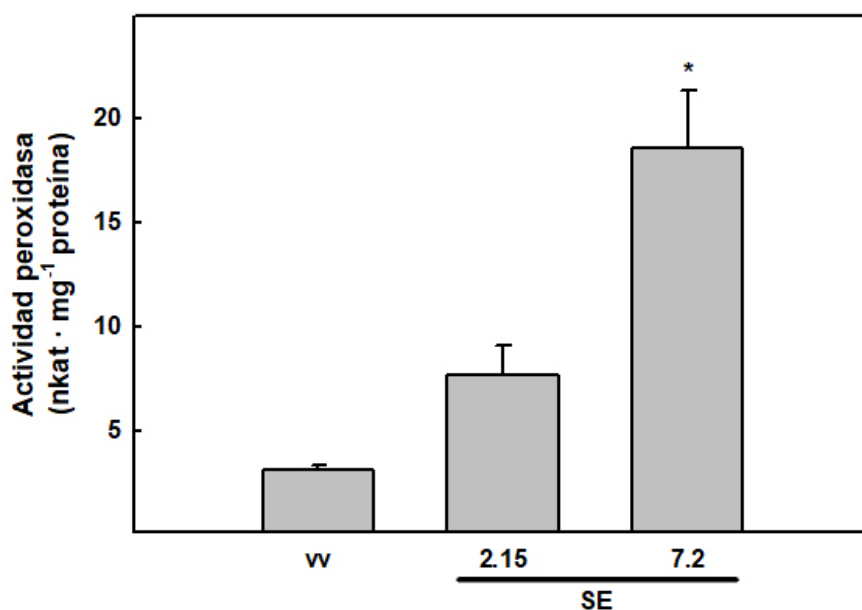
Las dos líneas de sobreexpresión analizadas, SE 2.15 y SE 7.2, mostraron una expresión alta del gen *ZePrx* en muestras de hoja de plantas de tres semanas (Fig. IV.30); al igual que en lo observado para el tallo (Fig. IV.3). Esto es esperable debido a que el promotor escogido (CaMV35S) es un promotor constitutivo y, por lo tanto, la expresión de los genes dirigidos por este promotor no depende del tejido (Odell *et al.* 1985).



**Figura IV.30. Expresión de *ZePrx*.** Resultado de la rt-PCR semicuantitativa en muestras de hoja de plantas de tres semanas de las diferentes líneas transgénicas obtenidas. A. *ZePrx*. B.  $\beta$ -tubulina 1 (U91564.2). M: Marcador, se indica el tamaño en pb de la banda más intensa. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión.

### 7.2. Determinación de la actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7)

Se determinó la actividad peroxidasa frente a 4MN en muestras de proteínas solubles totales e iónicamente ligadas a la pared. Esta resultó ser significativamente más alta en la línea SE 7.2 que en las transformadas con el vector vacío, alcanzando en esta línea un valor cuatro veces mayor (Fig. IV.31). La línea SE 2.15 también mostró una actividad media superior a la de las líneas control, pero sin que se detectaran diferencias significativas, tendencia observada también en algunas muestras de las proteínas del tallo (Figs. IV.7 y IV.10). Esto sugiere que los posibles mecanismos de control que se estén ejerciendo sobre la actividad peroxidasa están actuando de forma similar en tallo y hoja, ya que la actividad peroxidasa presenta, dentro de cada línea, un comportamiento semejante para los diferentes tejidos. Este concuerda con lo observado por Elfstrand *et al.* (2002), en cuyo trabajo, la sobreexpresión de una peroxidasa de clase III causó un aumento similar de la actividad peroxidasa en las hojas y en el tallo. Sin embargo, el aumento en la actividad peroxidasa fue mucho más



**Figura IV.31. Actividad peroxidasa en hoja.** Actividad peroxidasa específica medida frente a 4MN en muestras de proteínas totales de hojas de tres semanas. vv: vector vacío (media 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).



acusado en la hoja (Fig. IV.31) que en el tallo (Figs. IV.7-10), lo que sugiere que en el segundo tejido existe un control más estricto sobre la actividad peroxidasa total.

### 7.3. *Cuantificación y determinación del estado redox del pool de ascorbato*

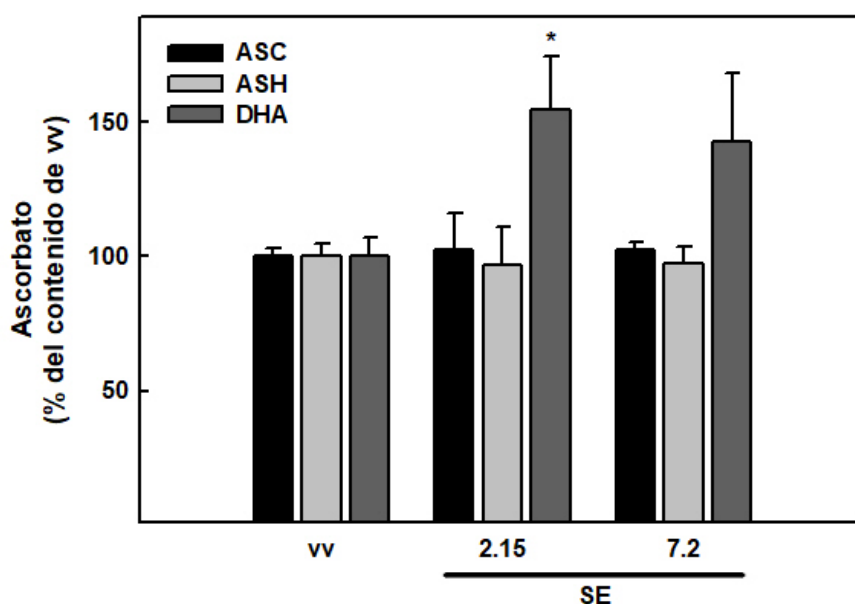
Se extrajo el *pool* de ascorbato de las hojas de plantas de tres semanas y se cuantificó el ascorbato total y el reducido. A partir de estos datos se calculó el contenido en ascorbato oxidado y se determinó la relación entre ascorbato reducido y ascorbato total (estado redox) para todas las muestras.

No se detectaron diferencias significativas entre el contenido de las distintas formas de ascorbato entre las líneas transgénicas, no obstante, el contenido medio en ascorbato oxidado fue superior en ambas líneas de sobreexpresión (Tabla IV.3). Por lo tanto, con el objetivo de apreciar mejor las tendencias en el contenido de las distintas formas de ascorbato, se calculó el porcentaje para cada línea considerando como 100% la media del contenido de las dos líneas de vector vacío (Fig. IV.32). De esta forma se observó que la línea SE 2.15 presentaba un incremento significativo del ascorbato oxidado, mientras que el incremento observado en SE 7.2 no resultó significativo. Esto podría sugerir que, al menos en la línea SE 2.15, el contenido en ROS ha aumentado ligeramente con respecto a las líneas de vector vacío y, como consecuencia, el *pool* de ascorbato está más oxidado. A pesar del aumento significativo en el porcentaje de ascorbato oxidado con respecto al control en la línea SE 2.15, esto no se tradujo en una reducción significativa del porcentaje de ascorbato reducido con respecto al total del *pool* en esta línea (Fig. IV.33). Aunque sí se pudo observar que en las líneas de sobreexpresión la media es menor que para las líneas de vector vacío, lo que corrobora la pequeña magnitud del cambio en este parámetro (Fig. IV.33).

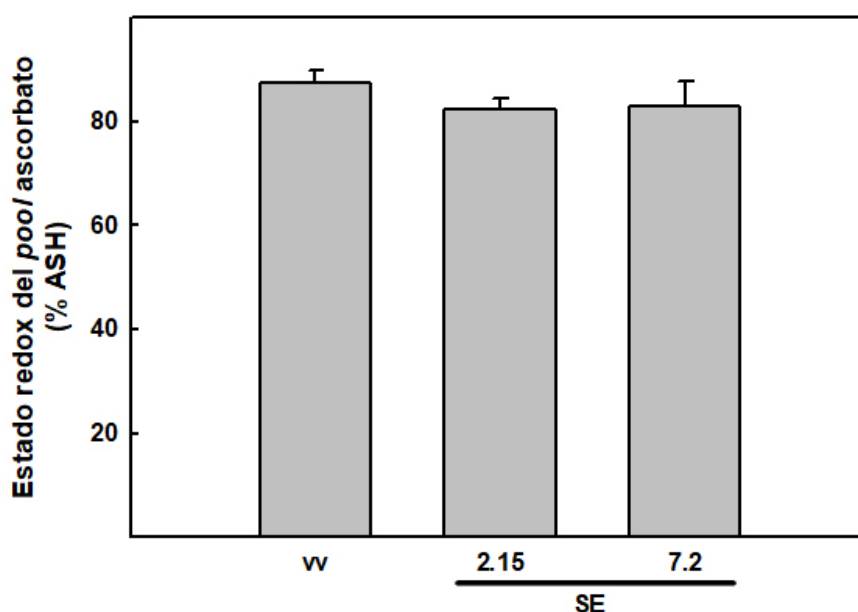
**Tabla IV.3. Contenido en ascorbato.** Valores correspondientes a la cuantificación de las diferentes formas de ascorbato en hojas de tres semanas. PF: peso fresco. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

Contenido en ascorbato (nmol · g <sup>-1</sup> PF)			
Línea	Ascorbato total	Ascorbato reducido	Ascorbato oxidado
vv	1359 $\pm$ 105	1186 $\pm$ 93	173 $\pm$ 33
SE 2.15	1371 $\pm$ 157	1121 $\pm$ 108	250 $\pm$ 54
SE 7.2	1391 $\pm$ 154	1140 $\pm$ 64	251 $\pm$ 93

Todas las muestras presentaron un porcentaje de ascorbato reducido superior al 80% (Fig. IV.33). Esto se corresponde con el estado habitual del *pool* ascorbato, en el que la mayoría de este compuesto se encuentra en su estado reducido (Foyer & Noctor 2011), en disposición de ser oxidado para amortiguar la producción de ROS en la célula.



**Figura IV.32. Cuantificación de las distintas formas de ascorbato.** Contenido en las diferentes formas de ascorbato (% con respecto al control) de las hojas de plantas de tres semanas de *N. tabacum*. ASC: ascorbato total. ASH: ascorbato reducido. DHA: ascorbato oxidado. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura IV.33. Estado redox del *pool* de ascorbato.** Relación entre el contenido en ascorbato reducido (ASH) con respecto al total de las hojas de plantas de tres semanas de *N. tabacum*. vv: vector vacío (media 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 7.4. Cuantificación y determinación del estado redox del pool de glutatión

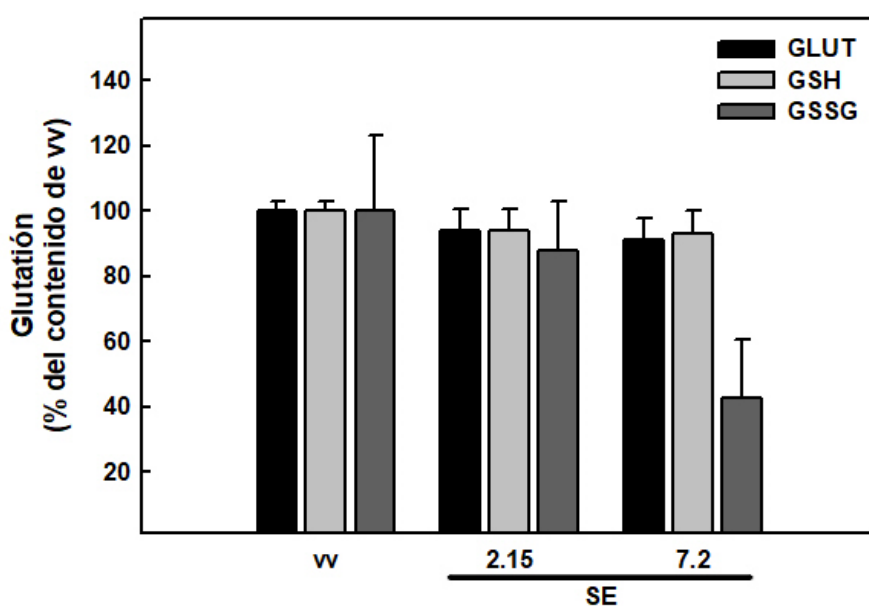
Junto con el *pool* de ascorbato se extrajo el glutatión celular y se cuantificó el contenido total en glutatión y su forma oxidada.

Igual que en el caso del ascorbato, no se detectaron diferencias significativas en el contenido total de glutatión en las diferentes muestras (Tabla IV.4). De nuevo, se determinó el porcentaje de cada compuesto considerando el 100% como la media de las dos líneas de vector vacío pero tampoco se detectaron diferencias significativas, aunque el contenido en glutatión en todas sus formas fue menor en el caso de las líneas de sobreexpresión y más acusado en el caso del glutatión oxidado (Fig. IV.34). En todas las muestras el glutatión reducido representó más de un 95% del glutatión total, lo que representa un estado fisiológico normal (Foyer & Noctor 2011). El hecho de que no se hayan detectado diferencias significativas en el estado de oxidación del *pool* de glutatión, concuerda con la variación de pequeña magnitud en el contenido en ascorbato oxidado, sugiriendo que hay pocas variaciones en el contenido en ROS. Además, mientras que el ascorbato ejerce su efecto antioxidante tanto en el interior

celular como en el apoplasto, el glutatión está ausente en este segundo compartimento (Fernández-García *et al.* 2009); y, dado que ZePrx es una peroxidasa de secreción (Gabaldón *et al.* 2005), es esperable que induzca cambios en el estado redox del ascorbato apoplástico, principalmente, aunque estos puedan ser transmitidos al simplasto *a posteriori*.

**Tabla IV.4. Contenido en glutatión.** Valores correspondientes a la cuantificación de las diferentes formas de glutatión en hojas de tres semanas. PF: peso fresco. vv: vector vacío (media 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

Contenido en glutatión (nmol $\cdot$ g <sup>-1</sup> PF)			
Línea	Glutatión total	Glutatión reducido	Glutatión oxidado
vv	133 $\pm$ 17	129 $\pm$ 17	1,95 $\pm$ 0,56
SE 2.15	122 $\pm$ 16	118 $\pm$ 17	1,56 $\pm$ 0,29
SE 7.2	120 $\pm$ 22	118 $\pm$ 22	0,83 $\pm$ 0,35



**Figura IV.34. Cuantificación de las distintas formas de glutatión.** Contenido en las diferentes formas de glutatión (% con respecto al control) de las hojas de plantas de tres semanas de *N. tabacum*. GLUT: glutatión total. GSH: glutatión reducido. GSSG: glutatión oxidado. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

7.5. *Determinación de la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación*

Por último, se determinó la actividad enzimática de las cuatro enzimas implicadas en el ciclo ascorbato-glutación y la actividad catalasa en extractos de proteínas solubles totales.

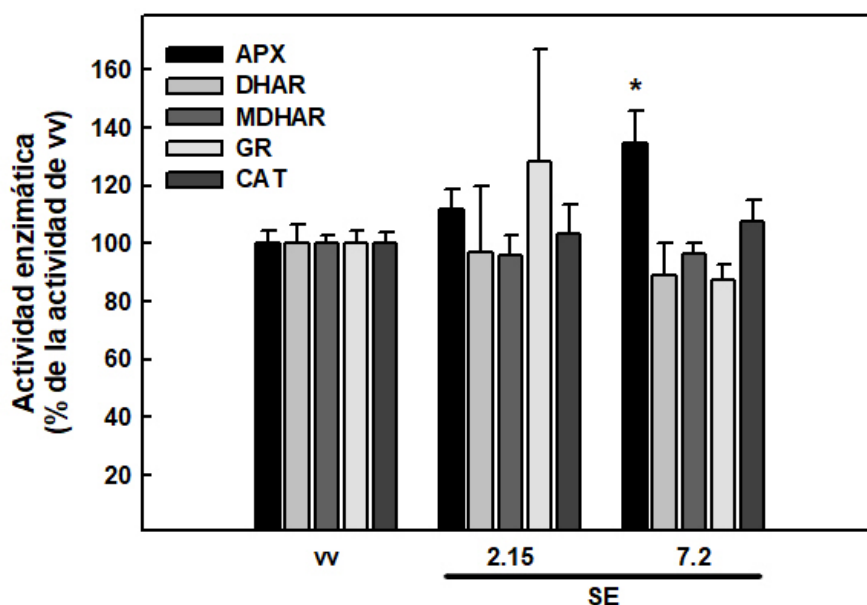
La cuantificación de las distintas actividades enzimáticas específicas no reveló diferencias significativas entre las líneas (Tabla IV.5). No obstante, sí que se observó que los resultados para la línea vv 10.3 presentaron un valor medio superior para todas las enzimas ensayadas a excepción de la glutación reductasa. Este resultado se atribuyó a que en esta línea la cuantificación de proteínas resultó también más baja, de media, que en el resto (no se muestran los resultados). Por ello, se determinó la actividad enzimática en base al peso fresco de tejido y se representó el porcentaje de la actividad de cada línea considerando el 100% la actividad media de las dos líneas control. Estos datos mostraron un incremento significativo de la actividad ascorbato peroxidasa en la línea SE 7.2 (Fig. IV.35). Esto concuerda con el aumento de la actividad ascorbato peroxidasa en plantas de tabaco que sobreexpresan la peroxidasa swpa4 de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (Kim *et al.* 2017).

**Tabla IV.5. Actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutación.** Valores de actividad enzimática específica para las enzimas del ciclo ascorbato-glutación en hojas de tres semanas. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los análisis estadísticos no detectaron diferencias significativas entre las líneas de sobreexpresión y las de vector vacío ( $\alpha = 0,05$ ).

Actividad enzimática específica (mM · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> proteína)					
Línea	APX	DHAR	MDHAR	GR	CAT
vv	5,05 $\pm$ 0,59	0,53 $\pm$ 0,06	1,30 $\pm$ 0,21	0,10 $\pm$ 0,01	2,06 $\pm$ 0,28
SE 2.15	4,46 $\pm$ 0,71	0,38 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,18	0,11 $\pm$ 0,05	1,68 $\pm$ 0,35
SE 7.2	5,70 $\pm$ 0,97	0,40 $\pm$ 0,09	1,02 $\pm$ 0,16	0,07 $\pm$ 0,01	1,83 $\pm$ 0,31

La ascorbato peroxidasa es la primera enzima del ciclo ascorbato-glutación y su función consiste en eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usándolo para oxidar ascorbato, consiguiendo, de esta manera, reducir los niveles de ROS (De Gara *et al.* 2010). Por lo tanto, una mayor actividad de esta enzima puede responder a una mayor presencia de peróxido de hidrógeno en la célula. No obstante, estos resultados contrastan con los obtenidos para

el *pool* de ascorbato (Fig. IV.32) en el que ambas líneas de sobreexpresión presentaron un valor medio superior de ascorbato oxidado, pero el incremento fue solo significativo en el caso de la línea SE 2.15. Estos dos resultados, un aumento de la actividad ascorbato peroxidasa y un aumento del contenido en ascorbato oxidado son coherentes entre sí, ya que, esta enzima oxida el ascorbato (De Gara *et al.* 2010). Sin embargo, la línea SE 2.15 no mostró un aumento de esta actividad enzimática, lo que sugiere que el ascorbato podría estar siendo oxidado también por otra vía. De hecho, la ascorbato peroxidasa no es la única enzima capaz de oxidar este compuesto. En el apoplasto la ascorbato oxidasa también puede catalizar esta reacción empleando O<sub>2</sub> en lugar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pudiendo afectar al contenido total de la hoja en ascorbato oxidado (Pignocchi *et al.* 2003). Por lo tanto, la oxidación del ascorbato podría deberse, al menos en parte, a la actividad de esta otra enzima.



**Figura IV.35. Actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión.** Actividad de las distintas enzimas del ciclo ascorbato-glutatión (% con respecto al control) en muestras las hojas de plantas de tres semanas de *N. tabacum*. APX: Ascorbato peroxidasa. DHAR: dehidroascorbato reductasa. MDHAR: monodehidroascorbato reductasa. GR: glutatión reductasa. CAT: catalasa. vv: vector vacío (media de 2 líneas). SE: sobreexpresión. Se representa la media  $\pm$  error estándar. n(línea) = 3. Los asteriscos (\*) indican qué líneas son significativamente diferentes con respecto al control ( $\alpha = 0,05$ ).

Por otro lado, el aumento en la actividad ascorbato peroxidasa observado en SE 7.2 podría deberse parcial o totalmente a la oxidación de ascorbato por parte de ZePrx, ya que esta enzima es capaz de oxidar el ascorbato *in vitro* (Gabaldón *et al.* 2005).

En función de si el aumento de actividad ascorbato peroxidasa se debe o no a la capacidad de ZePrx de oxidar ascorbato se abren dos posibles escenarios. Por un lado, si ZePrx está contribuyendo a aumentar la actividad ascorbato peroxidasa indicaría que predomina su ciclo peroxidativo. Mientras que si el aumento en esta actividad enzimática se debe exclusivamente a las peroxidases de clase I, indicaría que en las líneas de sobreexpresión está habiendo un aumento de ROS ( $O_2$ ,  $H_2O_2$  o radicales  $\cdot OH$  y  $OH^-$ ), es decir, que ZePrx estaría llevando a cabo su ciclo hidroxílico en las hojas de tabaco de estas plantas (Chen & Schopfer 1999). Ambas posibilidades han sido documentadas para otras peroxidases de clase III, contribuyendo en ambos casos a combatir diferentes tipos de estrés en la planta (Choi *et al.* 2007; Kawaoka *et al.* 2003; Kim *et al.* 2008).

Las enzimas DHA reductasa y MDHA reductasa, por su parte, mostraron una ligera tendencia a la baja en las líneas de sobreexpresión, aunque no se detectaron diferencias significativas (Tabla IV.5 y Fig. IV.35). Esta tendencia, no obstante, podría ayudar a explicar la acumulación del ascorbato oxidado, ya que la función de ambas consiste en la reducción de las formas oxidadas del ascorbato. Además, el hecho de que su actividad no aumente como respuesta al incremento del ascorbato oxidado explica que no se hayan detectado cambios en la cuantificación de las diferentes formas de glutatión e, incluso, el posible descenso de las formas oxidadas de glutatión (Fig. IV.34); ya que la DHA reductasa es la enzima responsable de conectar el estado redox de estos dos metabolitos (Foyer & Noctor 2011). Si bien la actividad de estas dos enzimas en situaciones de producción de ROS puede reducirse (Muscolo *et al.* 2003) o aumentar (Locato *et al.* 2008; Shan *et al.* 2018) en función del estímulo que origine el estrés; una menor cantidad de estas enzimas en la planta podría sugerir un menor estrés oxidativo en las hojas de las plantas de sobreexpresión, apoyando la idea de que ZePrx esté oxidando ascorbato *in vivo* y, por lo tanto, contribuyendo a la eliminación de ROS.

Tampoco se detectaron diferencias significativas en el caso de la actividad glutatión reductasa (Fig. IV.35), aunque la línea SE 7.2 muestra una ligera tendencia a la baja (Tabla IV.5). Estos resultados concuerdan con la ausencia de cambios en el

estado redox del *pool* glutatión y apuntan a que el impacto de la presencia de ZePrx ha sido reducido sobre el estado redox del citosol.

Por último, la actividad catalasa tampoco mostró diferencias significativas entre las líneas de vector vacío y las líneas de sobreexpresión (Tabla IV.5 y Fig. IV.35). Tanto esta enzima como la ascorbato peroxidasa actúan sobre el mismo sustrato, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, eliminándolo (De Gara *et al.* 2010). Por lo tanto, si hubiese un aumento del contenido en este compuesto en la célula se esperaría un aumento de ambas actividades enzimáticas, como, de hecho, se ha observado en respuesta a la sobreexpresión de otra peroxidasa de clase III (Kim *et al.* 2017). En consecuencia, la ausencia de un aumento de la actividad catalasa apoyaría que ZePrx esté oxidando ascorbato y, por lo tanto, contribuyendo a la actividad ascorbato peroxidasa. No obstante, la diferencia de tendencia entre las actividades ascorbato peroxidasa y catalasa podría deberse a la sublocalización celular de estas enzimas. Mientras que la ascorbato peroxidasa tiene una localización amplia en la célula, con isoenzimas en múltiples compartimentos celulares (De Gara *et al.* 2010), la catalasa se localiza principalmente en los peroxisomas (Feierabend 2005). Por lo tanto, dado que, al igual que ZePrx, la producción de ROS estaría localizada en el apoplasto, tiene sentido que la enzima más cercana por su localización subcelular, la ascorbato peroxidasa, se encargue en mayor medida de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, capaz de entrar a la célula a través de las acuaporinas de la membrana plasmática (Tian *et al.* 2016).

Los resultados obtenidos, por lo tanto, aunque parecen apoyar en mayor medida una actividad ascorbato peroxidasa de ZePrx, tampoco permiten descartar la opción de que esté participando en la generación de ROS. La sobreexpresión de peroxidasas de clase III ha permitido comprobar que estas enzimas son capaces de desarrollar ambos papeles. La oxidación de ascorbato por parte de este tipo de enzimas aumenta la resistencia al estrés oxidativo (Kawaoka *et al.* 2003); mientras que la producción de ROS (O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o radicales ·OH y OH<sup>-</sup>) contribuye a la protección frente a diferentes tipos de estrés tanto biótico como abiótico, como se ha visto para otras peroxidasas de clase III (Choi *et al.* 2007; Kim *et al.* 2008). A pesar de que no se ha estudiado la expresión de ZePrx en respuesta a estrés, sí que hay estudios en los que se detectó un aumento de la actividad peroxidasa tras la exposición de plantas de *Z. elegans* a metales pesados (Badawy *et al.* 2017). Además, la simplicidad del patrón de peroxidasas que muestra *Z.*



*elegans* en varios de sus órganos (Gabaldón *et al.* 2005; López-Serrano *et al.* 2004) apoya la idea de que esta enzima esté implicada en varias funciones en la planta. La peroxidasa *swpa4* de *I. batatas* también se ha relacionado con diversas funciones mediante su sobreexpresión en tabaco, participando tanto en la lignificación como en la respuesta a distintos tipos de estrés y siendo capaz de consumir y producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kim *et al.* 2008). No obstante, para confirmar otras posibles funciones de ZePrx *in vivo* sería necesario estudiar la respuesta de las líneas de sobreexpresión a diferentes tipos de estrés, así como el comportamiento de ZePrx, tanto a nivel génico como proteico en la propia *Z. elegans* y, en caso de desarrollarse métodos de transformación para esta planta, estudiar el comportamiento de transformantes que no expresen ZePrx.

No obstante, es necesario más trabajo para poder comprender el efecto que está teniendo la sobreexpresión de ZePrx sobre las enzimas y metabolitos del ciclo ascorbato-glutatión. En particular, sería de especial interés determinar el contenido en peróxido de hidrógeno, así como determinar si los cambios observados en la actividad ascorbato peroxidasa se deben a peroxidases de clase I o de clase III.

### 8. Estudio del transcriptoma

#### 8.1. RNA-Seq

Dada la multitud de funciones que pueden desempeñar las peroxidases de clase III en la fisiología de la planta (Francoz *et al.* 2015) y las alteraciones detectadas en la composición de las ligninas y el contenido en glucosa de las paredes de la línea SE 7.2, se analizó el transcriptoma completo de las líneas vv 15.14 y SE 7.2 mediante secuenciación de nueva generación con el objetivo de determinar qué genes o rutas podían estar detrás de las modificaciones detectadas.

Para ello, se obtuvo el RNA de tallos de 6 semanas de tres plantas diferentes de cada línea. Tras comprobar la calidad del RNA, se construyó una librería para cada una de las muestras, se secuenciaron empleando un equipo Illumina HiSeq 2500. Las secuencias obtenidas se depuraron para eliminar las bases correspondientes a los adaptadores de cada librería y aquellas regiones de baja calidad en la secuenciación

**Caracterización funcional de la última etapa de la biosíntesis de ligninas mediante la sobreexpresión de peroxidasas en plantas modelo**

**Tabla IV.6. Estadísticas de secuenciación de RNA.** Número de lecturas totales y depuradas y datos de calidad (Q30) y contenido en GC de las secuencias depuradas. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión.

<b>Muestra</b>	<b>Lecturas totales</b>	<b>Lecturas depuradas</b>	<b>Q30 (%)</b>	<b>Contenido en GC (%)</b>
<b>vv 15.14 1</b>	9 798 554 592	9 655 755 271	93,24	43,39
<b>vv 15.14 2</b>	9 473 549 520	9 347 289 831	93,39	43,58
<b>vv 15.14 3</b>	9 575 083 608	9 439 905 630	93,15	43,35
<b>SE 7.2 1</b>	9 225 008 720	9 097 975 570	93,11	43,70
<b>SE 7.2 2</b>	9 372 290 960	9 237 204 588	93,15	43,49
<b>SE 7.2 3</b>	9 044 986 118	8 918 828 889	93,54	43,49

(Tabla IV.6). Una vez depuradas, las secuencias se mapearon contra el genoma de referencia de *N. tabacum* (Edwards *et al.* 2017) obteniéndose para todas las librerías un porcentaje similar de fragmentos mapeados (Tabla IV.7). Se identificaron 25921 genes de *N. tabacum* expresados en las muestras, de los que 22392 se expresaban en las 6 muestras analizadas. También se detectó la expresión de los dos genes introducidos en el vector, el gen de resistencia a higromicina en todas las plantas transgénicas y *ZePrx* en el caso de las plantas de sobreexpresión. Para estos dos genes y los 22392 de *N. tabacum* expresados en todas las muestras se calcularon sus valores de expresión normalizada, su cambio de expresión (*fold-change*) y se analizaron mediante una prueba t-Student para detectar diferencias significativas. Se consideraron como genes diferencialmente expresados (GDE) aquellos con un *fold-change* significativo cuyo valor absoluto fue superior a dos.

**Tabla IV.7. Estadísticas del mapeo.** Número de fragmentos empleados para el mapeo, mapeados y fracción (%) que representan del total. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión.

<b>Muestra</b>	<b>Fragmentos depurados</b>	<b>Fragmentos mapeados</b>	<b>%</b>
<b>vv 15.14 1</b>	96 101 878	68 318 867	71,09
<b>vv 15.14 2</b>	92 984 370	66 267 335	71,27
<b>vv 15.14 3</b>	93 924 452	66 553 422	70,86
<b>SE 7.2 1</b>	90 523 014	64 867 060	71,66
<b>SE 7.2 2</b>	91 938 980	65 482 077	71,22
<b>SE 7.2 3</b>	88 771 626	63 310 790	71,32

### 8.1.1. Genes diferencialmente expresados (GDE)

De los 22392 genes analizados, 783 mostraron un cambio significativo de su expresión ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), pero sólo se identificaron como GDE ( $|fc| > 2$  y  $p$ -valor  $< 0,05$ ) 22 genes de *N. tabacum* y los dos genes introducidos en el vector: *HygR* y *ZePrx* (Fig. IV.36 y Tablas IV.8 y 9). A excepción de estos dos últimos, todos presentaron un valor absoluto de *fold-change* entre dos y tres.

Las diferencias de expresión que mostró el gen de resistencia a antibiótico (*HygR*) (Tabla IV.8) probablemente se deban al lugar de inserción. No obstante, aun a pesar de observarse una notable diferencia en el nivel de expresión génica, en ambos casos esta fue suficiente como para haber permitido una selección de las líneas en base a su resistencia a higromicina B. En cambio, la diferencia de expresión observada en el caso de *ZePrx* (Tabla IV.9) entre vv 15.14 y SE 7.2 es lo esperable debido a que la primera carece del gen y se corresponde con lo observado en la PCR semicuantitativa (Fig. IV.3).

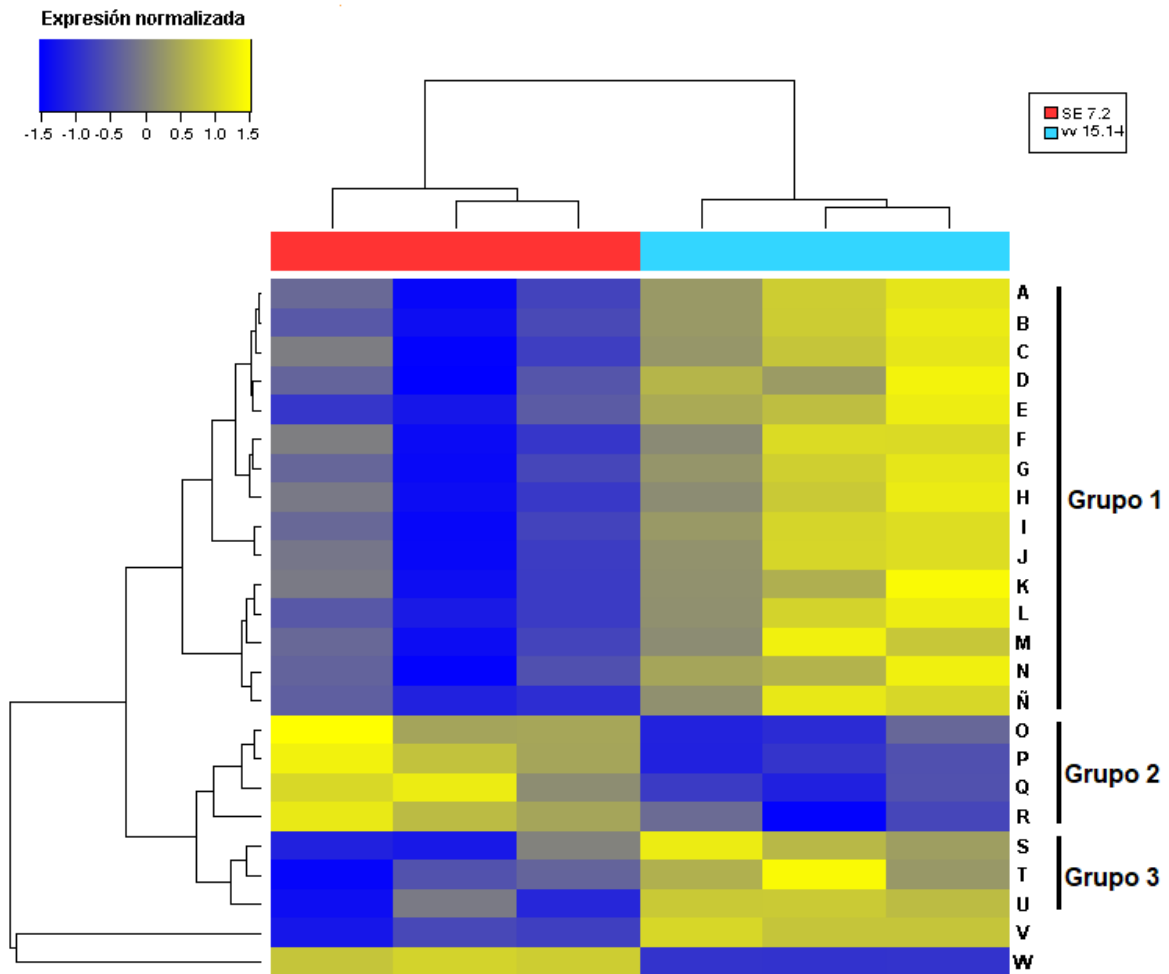
Los GDE se estudiaron mediante un agrupamiento jerárquico en función de los valores de expresión normalizados para las 6 muestras analizadas y se pudieron diferenciar 5 grupos (Fig. IV.36). Cada uno de los genes introducidos en el vector (*ZePrx* e *HygR*) constituyó su propio grupo, presentando un patrón claramente diferenciado del de los genes de *N. tabacum*. Estos, en cambio, se organizaron en tres conjuntos, dos de genes que se reprimieron en esta línea (18 genes, grupos 1 y 3) (Tabla IV.8) y uno de genes inducidos en SE 7.2 (4 genes, grupo 2) (Tabla IV.9).

En el primer grupo, constituido por 15 genes reprimidos (Fig. IV.36), encontramos una importante representación de genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared secundaria (11 de 15) (Tabla IV.8), que abarcan los tres componentes principales de la misma: ligninas (PAL y lacasa), celulosa (CESA4, CESA7 y COBL4) y xilano (GT43, GT8 y tres proteínas con dominio DUF579). En este grupo de expresión se encontró también un gen homólogo de *AtFAS11* que codifica una proteína arabinogalactano similar a fasciclina, relevante en las propiedades mecánicas de la pared secundaria (MacMillan *et al.* 2010).

En los tallos de 6 semanas de ambas líneas se detectó la expresión de los genes que codifican las cuatro isoenzimas de PAL que presenta *N. tabacum* (Reichert *et al.* 2009). Todos ellos mostraron una reducción significativa de su expresión en la línea SE

7.2, siendo la isoforma de menor expresión la que presentó una reducción más notable ( $fc = -2,12$ ) y la única incluida entre los GDE (Tabla IV.8). La PAL es la enzima que inicia la ruta de biosíntesis de múltiples metabolitos secundarios, entre ellos los monolignoles (Bonawitz & Chapple 2010). Desempeña un importante papel en el control del flujo de carbono del metabolismo primario al secundario (Bate *et al.* 1994) y, por lo tanto, en la biosíntesis de precursores de las ligninas. Por su parte, las lacasas están implicadas, junto con las peroxidasas de clase III, en la polimerización oxidativa de las ligninas (Berthet *et al.* 2011; Wang *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2013). Estos resultados contrastan con los obtenidos para el contenido total en ligninas (Fig. IV.16) para el que no se encontraron diferencias entre las líneas. No obstante, aunque la reducción en la expresión de PAL puede provocar un descenso en el contenido en ligninas (Bate *et al.* 1994), sus productos son precursores de múltiples metabolitos secundarios. Sin embargo, dado que no se observaron cambios en las enzimas de la ruta de biosíntesis de los monolignoles estas podrían estar produciendo suficientes alcoholes *p*-hidroxicinámicos como para que no se produzca una reducción en el contenido en ligninas de las paredes. En ese caso, la producción de otros metabolitos secundarios podría haberse visto afectada por la reducción del flujo de carbono hacia el metabolismo secundario. Por otro lado, el aumento en el valor medio de la actividad peroxidasa frente al alcohol sináplico en el apoplasto (Figs. IV.7 y IV.9), además de modificar el ratio S/G de las ligninas (Fig. IV.19) podría estar paliando el descenso de la expresión del gen de lacasa, al aumentar la polimerización oxidativa debida a peroxidasas.

En el caso de los genes codificantes de celulosa sintasas (*CesAs*) presentes en el grupo 1 de GDEs observamos una represión en la línea SE 7.2 de dos subunidades implicadas en la formación de la pared secundaria (Tabla IV.8), ya que son homólogas a las subunidades 4 y 7 de *A. thaliana* (McFarlane *et al.* 2014). Otros dos genes que codifican para CESAs típicas de pared secundaria también mostraron una reducción significativa de su expresión aunque los valores de  $fc$  no llegaron a un valor absoluto de 2 (Nitab4.5\_0003295g0200,  $fc = -1,98$  y Nitab4.5\_0000437g0170,  $fc = -1,99$ ). No obstante, la reducción de la expresión de estos genes no se reflejó en un menor contenido en celulosa de la línea SE 7.2 (Fig. IV.22). Esto se debe a que en el tallo se



**Figura IV.36. Agrupamiento de los genes diferencialmente expresados (GDE).** Agrupamiento jerárquico de los genes que se clasificaron como GDE ( $|fold-change| > 2$ ,  $p$ -valor  $< 0,05$ ). Se representa el cambio en la expresión normalizada en las tres muestras de cada línea transgénica. En vertical se representa cada una de las réplicas y en horizontal los diferentes GDE. A: Nitab4.5\_0000604g0080. B: Nitab4.5\_002003g0010. C: Nitab4.5\_0003077g0050. D: Nitab4.5\_0007693g0030. E: Nitab4.5\_0000496g0150. F: Nitab4.5\_0001783g0090. G: Nitab4.5\_0002389g0020. H: Nitab4.5\_0000939g0030. I: Nitab4.5\_0002611g0020. J: Nitab4.5\_0000101g0040. K: Nitab4.5\_0000794g0030. L: Nitab4.5\_0002229g0130. M: Nitab4.5\_0000278g0210. N: Nitab4.5\_0000669g0220. Ñ: Nitab4.5\_0000582g0180. O: Nitab4.5\_0001105g0220. P: Nitab4.5\_0000023g0480. Q: Nitab4.5\_0000130g0150. R: Nitab4.5\_0006658g0010. S: Nitab4.5\_0000617g0190. T: Nitab4.5\_0000977g0040. U: Nitab4.5\_0000835g0090. V: *HygR*. W: *ZePrx*. Los GDE de *N. tabacum* se dividieron en tres grupos en función de su patrón de expresión. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión.

están expresando más de 15 genes que codifican para CESAs, siendo los que mostraron una mayor expresión los correspondientes a subunidades de tipo 1, 3 y 6, encargadas de la biosíntesis de la pared primaria (no se muestran los datos). Esto es consistente con el hecho de que en las plantas de 6 semanas los tallos aún están creciendo y están constituidos por una mezcla de tejidos primarios y secundarios. Por lo tanto, hay células sintetizando su pared primaria, mientras que el xilema, principal tejido en el que se lleva a cabo la biosíntesis de pared secundaria, sólo representa una fracción del tallo. Por lo tanto, esto podría explicar que, a pesar del descenso de la expresión de varios genes *CesA*, no se hayan visto afectados los niveles totales de celulosa en las paredes celulares de la línea SE 7.2 (Fig. IV.22).

En la biosíntesis de celulosa intervienen, además, otras proteínas encargadas de controlar el ensamblaje de las cadenas de celobiosa en microfibrillas (Meents *et al.* 2018). Una de estas proteínas, las de tipo COBRA, juegan un papel especialmente importante al propiciar la formación de fibras cristalinas de celulosa en la pared (Li *et al.* 2003b; Liu *et al.* 2013), siendo las COBL4 las encargadas de esta función en la pared secundaria (Persson *et al.* 2005). Se identificaron tres genes que codifican para estas proteínas en el RNA de los tallos de 6 semanas y todos ellos mostraron una reducción de su expresión, siendo una de ellas un GDE (Tabla IV.8). Por lo tanto, a pesar de que no se observó una reducción en el contenido en celulosa de las paredes (Fig. IV.22), la reducción de la expresión de *COBL4*, combinada con una mayor proporción de celulosa sintetizada por subunidades de pared primaria, podría estar provocando una reducción en la proporción de celulosa cristalina. Al analizar las paredes celulares de la línea SE 7.2 detectamos un aumento en el contenido en glucosa de las paredes a 8 semanas (Fig. IV.23). Este dato indica un mayor contenido en la pared de polisacáridos de glucosa no cristalinos, ya que estos son los que pueden degradarse durante el tratamiento con TFA (Foster *et al.* 2010). Por lo tanto, los resultados de expresión apoyarían la idea de que este aumento de glucosa se deba a la presencia de una mayor proporción de celulosa no-cristalina en la pared celular, en lugar de a un mayor contenido en xiloglucano.

Entre los GDEs del grupo 1 también se encuentran 5 genes relacionados con la biosíntesis de glucurunoxilano, el glucano de entrecruzamiento propio de las paredes secundarias de dicotiledóneas (Zhong & Ye 2015). Estos genes codifican para

glucosiltransferasas de las familias 43 y 8 y tres proteínas con dominio DUF579 (Tabla IV.8). Las glucosiltransferasas de la familia 43 (GTs43) se encargan de la biosíntesis del esqueleto de xilano, mientras que las GTs8 participan en la biosíntesis de este polisacárido añadiendo las cadenas laterales de ácido glucurónico (Mortimer *et al.* 2010). Por su parte, en *A. thaliana* se han descrito proteínas con dominio DUF579 que participan en la deposición de xilano en la pared secundaria (Brown *et al.* 2011) y la metilación de las unidades de ácido glucurónico presente en sus cadenas laterales (Lee *et al.* 2012). Los dobles mutantes de pérdida de función en estos genes suelen presentar una reducción del contenido de las paredes en xilosa y ácidos glucurónicos, como consecuencia de una menor biosíntesis de glucurunoxilano, no obstante, este fenotipo no es tan común en los mutantes que afectan a un único gen, lo que indica una alta redundancia de los genes implicados en la biosíntesis de este compuesto (Brown *et al.* 2011; Keppler & Showalter *et al.* 2010; Lee *et al.* 2012; Mortimer *et al.* 2010). Esto concuerda con los datos obtenidos en este trabajo. Los tallos de 6 semanas expresaron varias isoformas de cada uno de estos genes (5 GTs43, 41 GTs8 y 7 proteínas con dominio DUF579) y, aunque, además de los GDE, alguna de estas isoformas también presentó una reducción de su expresión en SE 7.2 (no se muestran los datos), la expresión conjunta de todas ellas probablemente sea suficiente para mantener la biosíntesis de glucurunoxilano a niveles de vv 15.14. Esto es lo que sugiere que no se hayan observado diferencias en el contenido de xilosa y ácidos urónicos de la pared entre vv 15.14 y SE 7.2 (Fig. IV.23). De igual manera, los mutantes que afectan a los genes implicados en la biosíntesis de polisacáridos de pared (celulosa sintasas, glucosiltransferasas, proteínas arabinogalactano y proteínas con dominio DUF579) se han clasificado como mutantes *irx* o de xilema irregular (Brown *et al.* 2011; Keppler & Showalter *et al.* 2010; Persson *et al.* 2005; Zhong & Ye 2015), lo que pone de manifiesto su relevancia en la biosíntesis de la pared secundaria. Sin embargo, a pesar de la reducción de la expresión de estos genes, en la línea SE 7.2 no se detectaron cambios en la estructura del tejido vascular (Figs. IV.20-21). Esto indica, por lo tanto, que la expresión en la línea SE 7.2 de estos genes es suficiente para un normal desarrollo de las paredes secundarias en estas plantas, como pone de manifiesto que las paredes de los tallos de esta línea no pudieran diferenciarse mediante FT-IR de las líneas de vector vacío (Figs. IV.24-26).

**Caracterización funcional de la última etapa de la biosíntesis de ligninas mediante la sobreexpresión de peroxidasa en plantas modelo**

**Tabla IV.8. Genes reprimidos.** Genes con un *fold-change* (*fc*) inferior a -2 que resultaron ser significativamente distintos entre las muestras de sobreexpresión de la línea 7.2 y la línea de vector vacío 15.14. Se muestra el valor de *fc* ± error estándar.

<b>Código</b>	<b>Descripción</b>	<b><i>fc</i></b>
-	Higromicina B fosfotransferasa ( <i>HygR</i> )	-4,88 ± 0,25
- Grupo 1 -		
Nitab4.5_0000278g0210	Lacasa	-2,82 ± 0,45
Nitab4.5_0001783g0090	Proteína similar a germina RmlC-like jelly roll fold	-2,45 ± 0,43
Nitab4.5_0003077g0050	Proteína de unión a calmodulina	-2,24 ± 0,38
Nitab4.5_0000939g0030	Proteína de tipo COBRA ( <i>COBL4</i> )	-2,20 ± 0,37
Nitab4.5_0000496g0150	Aspártico-endopeptidasa nepentesina I ( <i>NAP</i> )	-2,19 ± 0,22
Nitab4.5_0000669g0220	Glucosiltransferasa de la familia 43 ( <i>GT43</i> )	-2,18 ± 0,32
Nitab4.5_0002003g0010	Proteína de función desconocida DUF579 ( <i>IRX15L</i> )	-2,17 ± 0,27
Nitab4.5_0000101g0040	Proteína arabinogalactano similar a fasciclina	-2,13 ± 0,33
Nitab4.5_0007693g0030	Proteína de función desconocida DUF579 ( <i>GUX</i> )	-2,13 ± 0,34
Nitab4.5_0000582g0180	Fenilalanina amonio liasa ( <i>PAL</i> )	-2,12 ± 0,26
Nitab4.5_0002611g0020	Celulosa sintasa ( <i>CesA7</i> )	-2,10 ± 0,28
Nitab4.5_0000794g0030	Proteína de unión a peptidoglucano	-2,09 ± 0,38
Nitab4.5_0002229g0130	Glucosiltransferasa de la familia 8 ( <i>GT8</i> )	-2,07 ± 0,33
Nitab4.5_0002389g0020	Celulosa sintasa ( <i>CesA4</i> )	-2,04 ± 0,28
Nitab4.5_0000604g0080	Proteína de función desconocida DUF579 ( <i>IRX15L</i> )	-2,02 ± 0,27
- Grupo 3 -		
Nitab4.5_0000835g0090	Proteína con dedo de zinc de tipo GRF	-3,17 ± 0,40
Nitab4.5_0000977g0040	Sulfato adenililtransferasa ATP-sulfurilasa	-2,41 ± 0,40
Nitab4.5_0000617g0190	Metil jasmonato esterasa	-2,07 ± 0,25

El patrón de expresión de estos genes implicados en el metabolismo de la pared secundaria es compartido por otros cuatro genes (Fig. IV.36 y Tabla IV.8), lo que apunta a una regulación común de todos ellos. Estos cuatro codifican para una proteína similar a germina (Nitab4.5\_0001783g0090), una aspártico-endopeptidasa similar a nepentesina I (Nitab4.5\_0000496g0150), una proteína de unión a calmodulina (Nitab4.5\_0003077g0050) y una proteína de unión a peptidoglucano (Nitab4.5\_0000794g0030). Estas proteínas se han relacionado con diferentes funciones en las plantas, estando todas ellas relacionadas con respuestas a diversos



tipos de estrés (Bender & Snedden 2013; Brotman *et al.* 2012; Davidson *et al.* 2009; Simões & Faro 2004). Por otro lado, las proteínas de unión a calmodulina, algunas proteínas similares a germina y miembros de la familia de las aspártico-endopeptidasas de tipo nepentesina (NAPs) se han relacionado con la muerte celular programada y procesos de la remodelación de la pared (Kobayashi & Fukuda 1994; Mathieu *et al.* 2006; Simões & Faro 2004; Takahashi *et al.* 2008). La muerte celular programada está coordinada con la formación de la pared secundaria durante la diferenciación del xilema, lo que explicaría que estos genes se regulasen conjuntamente con los de la pared secundaria (Zhong & Ye 2015).

En resumen, observamos una inhibición de múltiples genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria en la línea SE 7.2 con respecto a vv 15.14, lo que apoya la idea de que *ZePrx* desempeña un papel en este proceso. El estudio de mutantes ha permitido documentar casos en los que los cambios en un componente de la pared secundaria se ven compensados por alteraciones en la biosíntesis de otros (Li *et al.* 2003b). Si bien, en este caso no se observó un aumento de las ligninas, el aumento del ratio S/G de las mismas y de la actividad peroxidasa podría haber propiciado la alteración de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria para mantener las propiedades de la misma. De hecho, las diferencias en la composición de la pared detectadas en los tallos de 8 semanas de las plantas la línea SE 7.2 –aumento del ratio S/G (Fig. IV.19) y del contenido en glucosa (Fig. IV.23)– tienen efectos antagónicos sobre el comportamiento mecánico del tallo, que no se vio alterado en las plantas de esta edad (Figs. IV.27-29).

Además de los GDEs, se observó que buena parte de los genes expresados en el tallo que están implicados en la biosíntesis de pared secundaria fueron objeto de una reducción significativa de su expresión en la línea SE 7.2, aunque no alcanzaron un  $|fc|$  mayor a dos. Las familias génicas más afectadas por esta inhibición fueron la PAL y las CESAs de pared secundaria. Esta regulación conjunta podría deberse a que la sobreexpresión de *ZePrx* esté provocando cambios en el desarrollo del tallo. Sin embargo, los datos biométricos no apoyan esta hipótesis, al no detectarse diferencias en el desarrollo de las líneas (Figs. IV.14-15). Además, no todos los genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria se han visto sometidos a regulación (p.e. ruta específica de los monolignoles).

**Tabla IV.9. Genes inducidos.** Genes con un *fold-change* (*fc*) superior a 2 que resultaron ser significativamente distintos entre las muestras de sobreexpresión de la línea 7.2 y la línea de vector vacío 15.14. Se muestra el valor de *fc* ± error estándar.

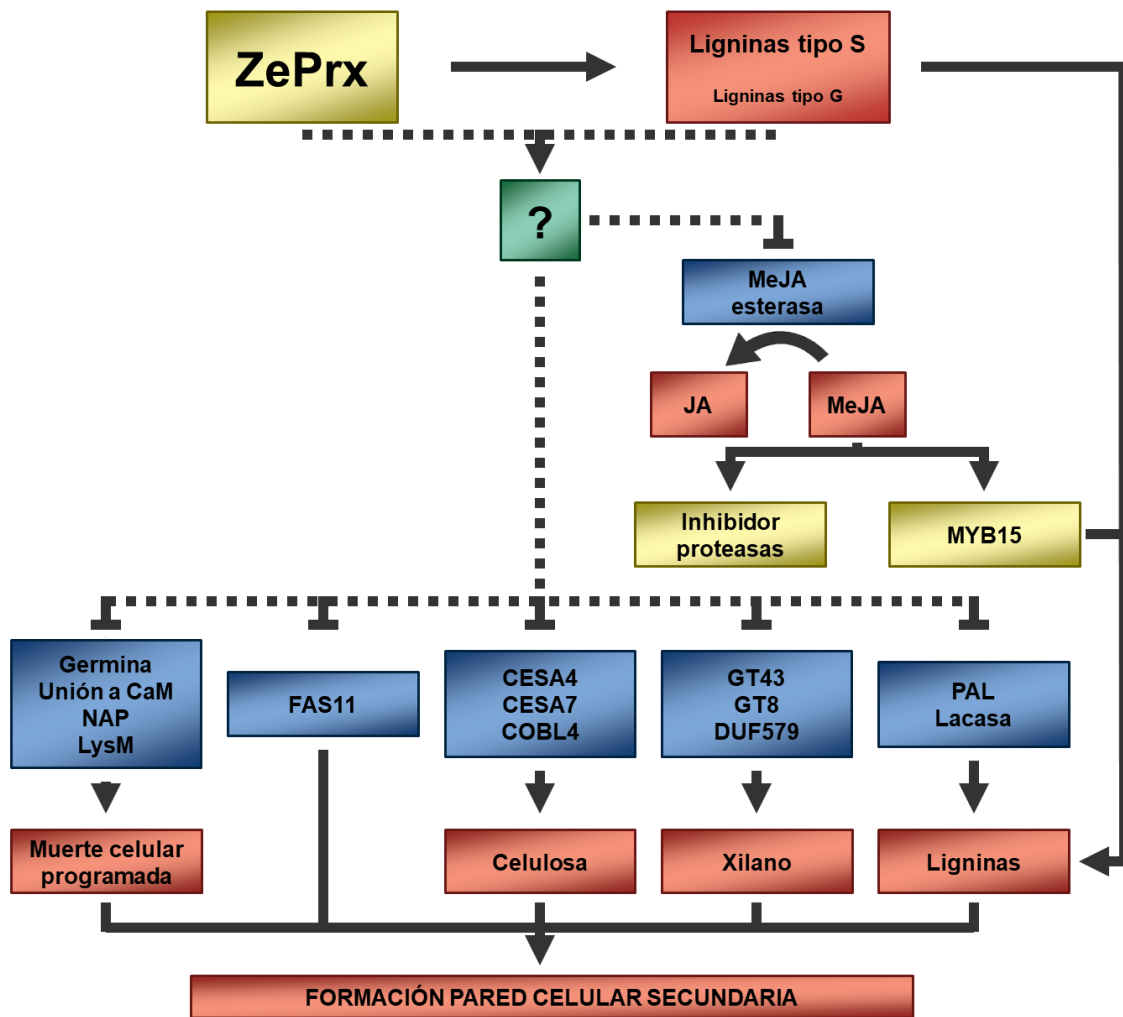
<b>Código</b>	<b>Descripción</b>	<b><i>fc</i></b>
-	Peroxidasa básica de <i>Z. elegans</i> ( <i>ZePrx</i> )	-
- Grupo 2 -		
Nitab4.5_0000023g0480	Inhibidor de proteasas de tipo Kunitz	2,42 ± 0,23
Nitab4.5_0000130g0150	Tirosina fosfatasa	2,40 ± 0,29
Nitab4.5_0001105g0220	Proteína desconocida	2,19 ± 0,31
Nitab4.5_0006658g0010	Factor de transcripción de tipo MYB ( <i>MYB15</i> )	2,13 ± 0,30

Otra posible explicación consistiría en que la sobreexpresión de la peroxidasa básica de *Z. elegans* pueda estar siendo detectada por la planta como una fuente de estrés y, por lo tanto, desencadenando una respuesta que haya tenido como consecuencia la inhibición de parte de los genes implicados en la formación de la pared secundaria. Esto concuerda con el hecho de que existen diferentes formas de estrés que pueden afectar a la totalidad o a parte de la ruta de biosíntesis de la pared secundaria (Taylor-Teeple *et al.* 2015). Además, otros estudios también han apuntado a la regulación compensatoria de los genes implicados en la biosíntesis de la pared como respuesta a modificaciones en la misma (Vermerris & Abril 2015). Esta idea se ve apoyada porque algunos de los GDEs se han vinculado a respuestas a estrés. Este es el caso de la inducción en la línea SE 7.2 de la expresión de un factor transcripcional MYB, homólogo de *AtMYB15* (Tabla IV.9), implicado en la tolerancia al frío y al estrés salino (Agarwal *et al.* 2006; Ma *et al.* 2015), y la inhibición de la expresión de una metil jasmonato esterasa (Tabla IV.8). Esta enzima cataliza la reacción de conversión de metil jasmonato en ácido jasmónico, una hormona implicada en la respuesta a diferentes tipos de estrés (respuesta a herbívoros, a patógenos y la formación de heridas) (Browse 2009). Algunos estudios, además, apoyan una participación de MYB15 en la ruta de señalización del jasmonato (Almagro *et al.* 2014).

Dado que en la línea SE 7.2 se redujo la expresión de una metil jasmonato esterasa (Tabla IV.8), cabe esperar que en estas líneas haya un incremento de la acumulación de metil jasmonato y una reducción de la producción de ácido jasmónico y otras formas activas como la conjugada con isoleucina (Browse 2009). Por lo tanto,

dado que el metil jasmonato suele ejercer su acción tras su conversión a ácido jasmónico (Stitz *et al.* 2011; Wu *et al.* 2008), es de esperar que las respuestas inducidas por metil jasmonato en la línea SE 7.2 se vean reducidas. No obstante, el metil jasmonato también es capaz de inducir la expresión de algunos genes sin intermediación del ácido jasmónico, como los que codifican para inhibidores de proteasas (Wu *et al.* 2008). Esto concuerda con la inducción observada de uno de estos inhibidores en la línea SE 7.2 (Tabla IV.9). Por lo tanto, dado que la expresión de MYB15 es inducida por metil jasmonato (Almagro *et al.* 2014) y que su patrón de expresión coincide con el de inhibidores de proteasa (Fig. IV.36 y Tabla IV.9), cabría pensar que siga un patrón de inducción similar a los inhibidores de proteasa, independiente de la formación de ácido jasmónico.

Las vías de señalización del ácido jasmónico se han relacionado previamente con la respuesta a modificaciones en la biosíntesis de componentes de la pared (Mélida *et al.* 2015). Concretamente, se ha observado que la inhibición de la biosíntesis de celulosa puede provocar una activación de la vía de señalización del ácido jasmónico y desencadenar la lignificación ectópica de cultivos celulares de maíz. Por otro lado, el factor de transcripción MYB15 es capaz de inducir los genes de biosíntesis de las ligninas en respuesta a estrés biótico por unión a elementos AC en los promotores de estos genes (Chezem *et al.* 2017), por lo que cabe pensar que podría mediar en la inducción de la lignificación controlada por metil jasmonato. Sin embargo, a pesar de la inducción observada de MYB15 en SE 7.2 no se observa un aumento de la expresión de los genes implicados en lignificación ni una mayor lignificación (Fig. IV.16). Una posible explicación es que la inhibición observada para los genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria (Tabla IV.8) estuviese afectando también a los genes de biosíntesis de ligninas y que la inducción por parte de MYB15 devolviese a estos últimos a un nivel de expresión similar al de vv 15.14.



**Figura IV.37. Relación entre las proteínas que codifican los genes regulados en los tallos de 6 semanas.** Se muestran las posibles relaciones entre las proteínas codificadas por los genes que se indujeron (amarillo) o reprimieron (azul) en SE 7.2 con respecto a la línea vv 15.14; así como los procesos en los que intervienen o en la biosíntesis de qué compuestos intervienen (rojo). En trazo continuo se muestran las relaciones entre proteínas basadas en datos de la bibliografía y en trazo discontinuo las propuestas para explicar la regulación de genes observada. Las puntas de flecha indican una relación positiva entre elementos (inducción) y las líneas horizontales, una relación negativa (inhibición).

Por lo tanto, una posible explicación a los datos de expresión observados consistiría en que la sobreexpresión de *ZePrx* haya causado una inhibición de los genes de biosíntesis de pared secundaria, a modo de mecanismo homeostático para paliar un posible aumento de la biosíntesis de ligninas y, por tanto, una rigidez excesiva de las paredes celulares. A su vez, bien los cambios producidos en la estructura de la pared a

causa de esta inhibición, como una reducción de la celulosa cristalina en la pared; bien la propia sobreexpresión de *ZePrx*, podrían haber desencadenado la inhibición de la expresión de la enzima metil jasmonato esterasa. La reducción de la expresión de esta enzima podría haber causado un aumento en los niveles de metil jasmonato y este, a su vez, activar la expresión de MYB15 e inhibidores de proteasas. Por último, este factor de transcripción habría inducido la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de ligninas, reequilibrando su expresión (Fig. IV.37).

Para conocer las relaciones reales entre los distintos genes regulados en la línea SE 7.2 sería necesario obtener más información sobre las relaciones entre los mismos. En concreto, el trabajo con mutantes que afecten a dichos genes puede ser útil para desentrañar las interacciones entre estos genes, especialmente en el caso del factor transcripcional MYB15 y la metil jasmonato esterasa.

### 8.1.2. Expresión de las peroxidasas de clase III

Dado que, a pesar de la sobreexpresión de *ZePrx* en las líneas SE 2.15 y SE 7.2 (Fig. IV.3) no se observaron cambios significativos en la actividad peroxidasa frente a algunos sustratos (Figs. IV.7-10), especialmente en el caso de los monolignoles, estudiamos el patrón de expresión de las peroxidasas de clase III en el tallo de las plantas de 6 semanas.

Se identificaron 47 genes anotados como peroxidasas de clase III expresados en las 6 muestras estudiadas (Tabla IV.10), de los que ninguno se identificó como diferencialmente expresado en SE 7.2 frente a vv 15.14. Sólo uno (Nitab4.5\_0000651g0040) mostró diferencias significativas entre las dos líneas, siendo su *fc* de 1,34, por lo que no se consideró GDE. Es decir, las peroxidasas de clase III del tallo no se han visto sometidas a un control transcripcional como respuesta a la sobreexpresión de *ZePrx*.

De estos 47 genes el que mayor expresión presentó (Nitab4.5\_0002828g0020), mostró un valor de expresión normalizado medio en torno a 10 en ambas muestras (Tabla IV.10), mientras que *ZePrx* presentó un nivel de expresión medio en SE 7.2 de 12. Esta diferencia de dos puntos en el valor normalizado, que se encuentra en escala

**Caracterización funcional de la última etapa de la biosíntesis de ligninas mediante la sobreexpresión de peroxidasas en plantas modelo**

**Tabla IV.10. Peroxidasas de clase III expresadas.** Valores de expresión normalizados medios para cada muestra  $\pm$  el error estándar y el *fold-change* (*fc*) de las peroxidasas detectadas en todas las muestras del RNA-Seq. ID: código de identificación en la anotación de la versión de Edwards *et al.* 2017 del genoma de *N. tabacum*. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión. Los asteriscos (\*) indican las muestras para las que se detectó una diferencia significativa en la expresión entre las dos líneas ( $\alpha = 0,05$ ).

#	ID	Expresión en vv 15.14	Expresión en SE 7.2	<i>fc</i>
1	Nitab4.5_0002827g0020	10,51 $\pm$ 0,231	10,08 $\pm$ 0,201	-1,34 $\pm$ 0,31
2	Nitab4.5_0000006g0050	8,49 $\pm$ 0,17	8,40 $\pm$ 0,22	-1,06 $\pm$ 0,28
3	Nitab4.5_0003436g0020	8,12 $\pm$ 0,21	8,61 $\pm$ 0,40	-1,40 $\pm$ 0,45
4	Nitab4.5_0001952g0250	7,79 $\pm$ 0,13	7,95 $\pm$ 0,13	-1,12 $\pm$ 0,22
5	Nitab4.5_0001176g0090	6,91 $\pm$ 0,52	7,27 $\pm$ 0,20	-1,29 $\pm$ 0,55
6	Nitab4.5_0000466g0010	6,85 $\pm$ 0,12	6,81 $\pm$ 0,26	-1,02 $\pm$ 0,29
7	Nitab4.5_0000651g0040	6,14 $\pm$ 0,09	6,56 $\pm$ 0,09	-1,34 $\pm$ 0,13*
8	Nitab4.5_0000669g0080	5,79 $\pm$ 0,15	5,87 $\pm$ 0,12	-1,06 $\pm$ 0,20
9	Nitab4.5_0001789g0030	5,65 $\pm$ 0,23	5,28 $\pm$ 0,13	-1,29 $\pm$ 0,26
10	Nitab4.5_0001137g0050	5,59 $\pm$ 0,33	6,35 $\pm$ 0,31	-1,70 $\pm$ 0,45
11	Nitab4.5_0001789g0020	5,49 $\pm$ 0,05	4,93 $\pm$ 0,40	-1,47 $\pm$ 0,40
12	Nitab4.5_0003858g0010	5,16 $\pm$ 0,63	4,04 $\pm$ 0,11	-2,17 $\pm$ 0,64
13	Nitab4.5_0000502g0090	5,14 $\pm$ 0,13	5,29 $\pm$ 0,12	-1,11 $\pm$ 0,18
14	Nitab4.5_0000263g0190	3,83 $\pm$ 0,15	3,56 $\pm$ 0,10	-1,38 $\pm$ 0,18
15	Nitab4.5_0000241g0260	3,50 $\pm$ 0,14	3,21 $\pm$ 0,35	-1,22 $\pm$ 0,38
16	Nitab4.5_0002195g0020	3,35 $\pm$ 0,60	3,40 $\pm$ 0,12	-1,04 $\pm$ 0,62
17	Nitab4.5_0001315g0150	3,33 $\pm$ 0,08	3,40 $\pm$ 0,17	-1,05 $\pm$ 0,19
18	Nitab4.5_0001417g0090	2,93 $\pm$ 0,19	3,25 $\pm$ 0,24	-1,24 $\pm$ 0,31
19	Nitab4.5_0000682g0070	2,69 $\pm$ 0,06	2,85 $\pm$ 0,02	-1,11 $\pm$ 0,07
20	Nitab4.5_0000832g0040	2,68 $\pm$ 0,02	2,62 $\pm$ 0,32	-1,04 $\pm$ 0,32
21	Nitab4.5_0000021g0090	2,65 $\pm$ 0,62	3,35 $\pm$ 0,33	-1,62 $\pm$ 0,71
22	Nitab4.5_0000257g0130	2,62 $\pm$ 0,27	2,62 $\pm$ 0,25	-1,00 $\pm$ 0,37
23	Nitab4.5_0000038g0180	2,55 $\pm$ 0,26	2,60 $\pm$ 0,25	-1,04 $\pm$ 0,36
24	Nitab4.5_0000644g0160	2,52 $\pm$ 0,07	2,41 $\pm$ 0,01	-1,08 $\pm$ 0,07
25	Nitab4.5_0001110g0100	2,51 $\pm$ 0,17	2,34 $\pm$ 0,06	-1,12 $\pm$ 0,18
26	Nitab4.5_0004911g0010	2,36 $\pm$ 0,19	2,24 $\pm$ 0,16	-1,09 $\pm$ 0,24
27	Nitab4.5_0000273g0080	2,34 $\pm$ 0,06	2,26 $\pm$ 0,16	-1,05 $\pm$ 0,17
28	Nitab4.5_0000682g0080	2,33 $\pm$ 0,03	2,35 $\pm$ 0,03	-1,01 $\pm$ 0,04
29	Nitab4.5_0001223g0010	1,78 $\pm$ 0,32	2,18 $\pm$ 0,14	-1,34 $\pm$ 0,35
30	Nitab4.5_0000192g0130	1,66 $\pm$ 0,15	1,11 $\pm$ 0,18	-1,46 $\pm$ 0,17
31	Nitab4.5_0000185g0220	1,64 $\pm$ 0,10	1,63 $\pm$ 0,07	-1,01 $\pm$ 0,13
32	Nitab4.5_0000055g0250	1,58 $\pm$ 0,65	1,86 $\pm$ 0,13	-1,21 $\pm$ 0,66
33	Nitab4.5_0003097g0010	1,54 $\pm$ 0,18	1,79 $\pm$ 0,12	-1,19 $\pm$ 0,21
34	Nitab4.5_0000263g0180	1,45 $\pm$ 0,10	1,39 $\pm$ 0,24	-1,05 $\pm$ 0,26
35	Nitab4.5_0000078g0210	1,36 $\pm$ 0,18	1,30 $\pm$ 0,13	-1,04 $\pm$ 0,22
36	Nitab4.5_0000273g0180	1,19 $\pm$ 0,10	1,23 $\pm$ 0,08	-1,03 $\pm$ 0,13
37	Nitab4.5_0002050g0080	1,17 $\pm$ 0,19	1,32 $\pm$ 0,25	-1,11 $\pm$ 0,32
38	Nitab4.5_0004708g0050	1,08 $\pm$ 0,08	1,15 $\pm$ 0,08	-1,05 $\pm$ 0,11
39	Nitab4.5_0002518g0050	1,06 $\pm$ 0,41	1,07 $\pm$ 0,15	-1,00 $\pm$ 0,44
40	Nitab4.5_0000723g0110	0,71 $\pm$ 0,12	0,91 $\pm$ 0,18	-1,14 $\pm$ 0,22
41	Nitab4.5_0000375g0150	0,64 $\pm$ 0,19	0,74 $\pm$ 0,26	-1,07 $\pm$ 0,32
42	Nitab4.5_0000069g0300	0,43 $\pm$ 0,08	0,17 $\pm$ 0,03	-1,19 $\pm$ 0,09
43	Nitab4.5_0000027g0480	0,34 $\pm$ 0,16	0,33 $\pm$ 0,06	-1,01 $\pm$ 0,17
44	Nitab4.5_0000192g0140	0,26 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,10	-1,07 $\pm$ 0,12
45	Nitab4.5_0003354g0010	0,24 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,02	-1,00 $\pm$ 0,08
46	Nitab4.5_0000007g0230	0,16 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,03	-1,06 $\pm$ 0,03
47	Nitab4.5_0001315g0260	0,14 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,04	-1,05 $\pm$ 0,04

logarítmica, indica que a partir de las muestras de RNA de tallo de estas plantas se generaron 4 veces más fragmentos procedentes del mRNA de *ZePrx* que del gen más expresado de *N. tabacum* que codifica para una peroxidasa de clase III. Estos resultados concuerdan con el hecho de que en el patrón de peroxidasa observado mediante IEF las bandas correspondientes a *ZePrx* mostraron una alta intensidad de tinción, aunque no se detectó una diferencia tan notable con respecto a las demás bandas como la correspondiente a los niveles de expresión (Fig. IV.6). Esto, por lo tanto, apoya la idea de que los niveles de expresión de *ZePrx* no se corresponden exactamente con la cantidad de proteína traducida en cada línea, al igual que en el caso de las discrepancias observadas entre la actividad peroxidasa de SE 2.15 y SE 7.2 y sus respectivos niveles de expresión.

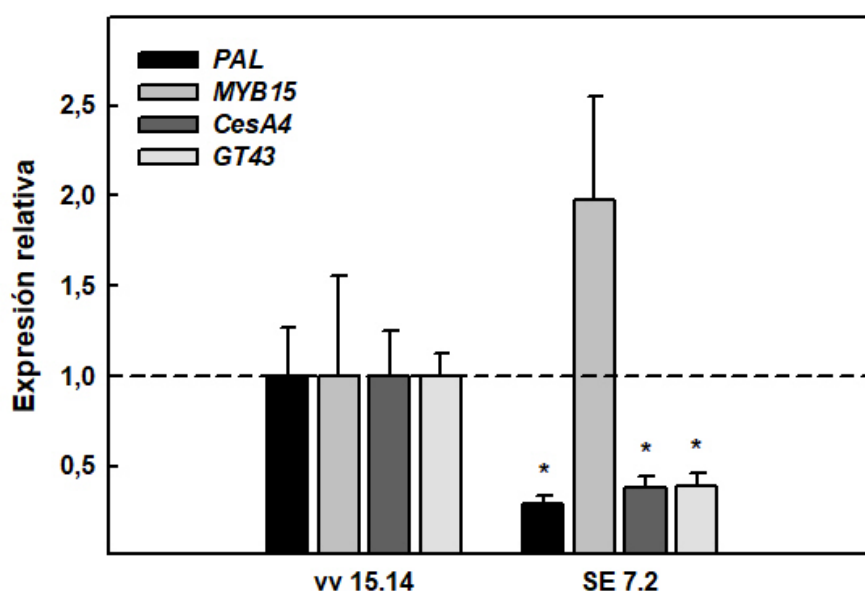
Es decir, la sobreexpresión empleando el promotor CaMV35S ha tenido como resultado una expresión alta del gen *ZePrx* pero eso no se ha traducido en un aumento de la actividad enzimática frente a algunos sustratos, principalmente el alcohol coniferílico (Figs. IV.7-10). A la vista de los resultados de secuenciación del transcriptoma, esto no puede atribuirse a un control transcripcional de otras isoenzimas (Tabla IV.10). Sin embargo, no se puede descartar que estos genes estén bajo la influencia de mecanismos de control de la traducción (Merchante *et al.* 2017) que podría explicar la ausencia de cambios en el caso de la actividad peroxidasa frente al alcohol coniferílico. Para confirmar esta hipótesis sería necesario cuantificar a nivel de proteína cada una de las isoenzimas para verificar que, efectivamente, alguna de ellas está siendo regulada para contrarrestar la presencia de *ZePrx*.

### 8.2. PCR en tiempo real

Dado el volumen de genes analizados, que puede dar pie a la aparición de falsos positivos, y con el objetivo de confirmar que los patrones de expresión observados en vv 15.14 y SE 7.2 se estudió la expresión de cuatro de los GDE en las cuatro líneas mediante PCR en tiempo real: tres reprimidos (*PAL*, *CesA4* y *GT43*) y uno inducido (*MYB15*).

Los cuatro genes analizados mostraron la misma tendencia que en el caso del RNA-Seq (Fig. IV.36). Es decir, los implicados en la biosíntesis de la pared secundaria (*PAL*, *CesA4* y *GT43*) mostraron una media inferior en SE 7.2, mientras que *MYB15*

mostró una expresión relativa media más alta en esta línea (Fig. IV.38). Además, en los cuatro genes la magnitud del cambio se mantuvo. En el RNA-Seq todos estos genes mostraron un *fc* cercano 2 en valor absoluto y, de acuerdo con ello, la expresión relativa determinada mediante rt-qPCR mostró que estos genes doblaron su expresión (*MYB15*) o la redujeron a la mitad (*PAL*, *CesA4* y *GT43*). Las diferencias detectadas resultaron significativas en el caso de *PAL*, *CesA4* y *GT43*, pero no en el caso de *MYB15*. Este último gen mostró la misma tendencia que en el RNA-Seq, pero no se pudo ratificar un cambio significativo en su expresión, aunque podría deberse a que el tamaño del efecto no es suficiente como para detectarse con el tamaño muestral empleado (Aarts *et al.* 2014).



**Figura IV.38. Expresión de GDEs en tallos de 6 semanas.** Resultado de la rt-qPCR en muestras de tallo de plantas de 6 semanas. *PAL*: fenilalanina amonio liasa. *MYB15*: factor de transcripción de tipo MYB homólogo a *AtMYB15*. *CesA4*: celulosa sintasa con homología a la subunidad 4 de *A. thaliana*. *GT43*: glucosiltransferasa de la familia 43. Se emplearon como genes de referencia la  $\beta$ -tubulina 1 (U91564.2) y la actina (AB158612) de *N. tabacum*. vv: vector vacío. SE: sobreexpresión. n = 3. Los asteriscos (\*) indican qué genes mostraron una expresión significativamente diferente en SE 7.2 con respecto a vv 15.14 ( $\alpha = 0,05$ )

Modificaciones del patrón de peroxidadas expresadas por la planta ya han sido relacionadas con cambios en la regulación de genes de la biosíntesis de los componentes de la pared secundaria. En concreto, en *A. thaliana* la supresión de los genes que codifican para las peroxidadas 4 y 52 tuvieron como consecuencia una



reducción de la expresión de múltiples genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria (Fernández-Pérez *et al.* 2014, 2015). Por lo tanto, a pesar de que en ambos casos tiene lugar una regulación de estos genes, la relación observada entre la modificación del patrón de peroxidasas y la regulación de los mismos es inversa; ya que, a diferencia de los trabajos previos, en este trabajo es la sobreexpresión de *ZePrx* lo que causa la inhibición. No obstante, en ambos casos apoya la idea de que estas isoenzimas participan en la biosíntesis de la pared secundaria.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo, que muestran que la sobreexpresión de *ZePrx* puede cambiar la composición de las ligninas y desencadenar cambios en la expresión génica que afectan a genes implicados en la biosíntesis de la pared secundaria, apoyan los de trabajos previos (Gabaldón *et al.* 2005, 2006, 2007; Gómez-Ros *et al.* 2007a, 2007b, 2012; Gutiérrez *et al.* 2009; López Núñez-Flores *et al.* 2010; López-Serrano *et al.* 2004; Ros Barceló 1998, 2005; Ros Barceló & Aznar-Asensio 2002; Ros Barceló *et al.* 2000, 2002a, 2002b) sobre la implicación de *ZePrx* en la formación de la pared celular secundaria mediante la participación en la polimerización oxidativa de las ligninas.



## ***V. CONCLUSIONS***

---



According to the results obtained in this work, the following conclusions had been reached:

- 1) *ZePrx* overexpression caused a change in peroxidase activity in tobacco plants increasing the syringyl-guaiacyl activity ratio according to its S-peroxidase type nature.
- 2) The transgenic line with a higher raise in syringyl-peroxidase activity, SE 7.2, showed an increased proportion of syringyl units in its lignins, backing *ZePrx* participation in lignin biosynthesis.
- 3) Besides the changes in lignins composition in SE 7.2, this line showed a raise in cell wall glucose content coming from non-crystalline polysaccharides. These two modifications have antagonistic effects on the mechanical properties of the stem, contributing to its stability. Furthermore, both, higher S/G lignins ratio and a higher proportion of glucose in non-crystalline polysaccharides are related to better saccharification properties.
- 4) *ZePrx* expression caused small changes on the ascorbate-glutathione cycle in overexpression tobacco plants, suggesting a possible involvement of *ZePrx* in stress responses.
- 5) The regulation of multiple genes involved in secondary cell wall biosynthesis in SE 7.2 line supports a role for *ZePrx* on it. Moreover, it implies the activation of mechanisms to prevent cell wall structure alteration as a response to the overexpression of *ZePrx*.
- 6) *ZePrx* overexpression had reduced pleiotropic effects, since there were no major changes in cell wall composition, gene expression, development or vascular tissue structure in the overexpressor lines.



## ***VI. BIBLIOGRAFÍA***

---





**Aarts S, van den Akker M & Winkens B.** 2014. The importance of effect sizes. *European Journal of General Practice*, 20 (1): 61-64.

**Agarwal M, Hao Y, Kappor A, Dong CH, Fujii H, Zheng X & Zhu JK.** 2006. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (49): 37636-37645.

**Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R & Staehelin A.** 2011. *Plant cell walls*. Garland Science, New York (Estados Unidos).

**Albersheim P, Nevins DJ, English PD & Karr A.** 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 5 (3): 340-345.

**Alejandro S, Lee Y, Tohge T, Sudre D, Osorio S, Park J, Bovet L, Lee Y, Geldner N, Fernie AR & Martinoia E.** 2012. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Current Biology*, 22 (13): 1207-1212.

**Almagro L, Carbonell-Bejerano P, Belchí-Navarro S, Bru R, Martínez-Zapater JM, Lijavetzky D & Pedreño MA.** 2014. Dissecting the transcriptional response to elicitors in *Vitis vinifera* cells. *PLOS ONE*, 9 (10): e109777.

**Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A & Pedreño MA.** 2009. Class III peroxidases in plant defense reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60 (2): 377-390.

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ.** 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.

**Amthor JS.** 2003. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Annals of Botany*, 91 (6): 673-695.

**Anterola AM & Lewis NG.** 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry*, 61 (3): 221-294.

**Anterola AM, van Rensburg H, van Heerden PS, Davin LB & Lewis NG.** 1999. Multi-site modulation of flux during monolignol formation in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261 (3): 652-657.

**Aoyama W, Sasaki S, Matsumura S, Mitsunaga T, Hirai H, Tsutsumi Y & Nishida T.** 2002. Sinapyl alcohol-specific peroxidase isoenzyme catalyzes the

formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol. *Journal of Wood Science*, 48 (6): 497-504.

**Badawy ESM, Ahmed AHH, Habba EEA & Soliman DM.** 2017. Effect of mycorrhizal fungi (AMF), brassinosteroids and sodium silicate on vegetative growth, flower production and Pb concentration of *Zinnia (Zinnia elegans)* plant under Pb stress. *Journal of Environmental Science and Technology*, 10 (4): 157-174.

**Barros J, Serk H, Granlund I & Pesquet E.** 2015. The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, 115 (7): 1053-1074.

**Bate NJ, Orr J, Ni W, Meromi A, Nadler-Hassar T, Doerner PW, Dixon RA, Lamb CJ & Elkind Y.** 1994. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (16): 7608-7612.

**Bender KW & Snedden WA.** 2013. Calmodulin-related proteins step out from the shadow of their namesake. *Plant Physiology*, 163 (2): 486-495.

**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 Physiology*, 121 (1): 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. *The Plant Cell*, 23: 1124-1137.

**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 (1): 163-176.

**Blumenkrantz N & Asboe-Hansen G.** 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54: 484-489.

**Boerjan W, Ralph J & Baucher M.** 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 519-546.

**Boija E & Johansson G.** 2006. Interactions between model membranes and lignin-related compounds studied by immobilized liposome chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758 (5): 620-626.

**Bolger AM, Lohse M & Usadel B.** 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30 (15): 2114-2120.

**Bonawitz ND & Chapple C.** 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetics*, 44: 337-363.

**Bonawitz ND & Chapple C.** 2013. Can genetic engineering of lignin deposition be accomplished without an unacceptable yield penalty? *Current Opinion in Biotechnology*, 24 (2): 336-343.

**Brotman Y, Landau U, Pnini S, Lisec J, Balazadeh S, Mueller-Roeber B, Zilberstein A, Willmitzer L, Chet I & Viterbo A.** 2012. The LysM receptor-like kinase LysM RLK1 is required to activate defense and abiotic-stress responses induced by overexpression of fungal chitinases in *Arabidopsis* plants. *Molecular Plant*, 5 (5): 1113-1124.

**Brown D, Wightman R, Zhang Z, Gomez LD, Atanassov I, Bukowski JP, Tryfona T, McQueen-Mason SJ, Dupree P & Turner S.** 2011. *Arabidopsis* genes *IRREGULAR XYLEM (IRX15)* and *IRX15L* encode DUF579-containing proteins that are essential for normal xylan deposition in the secondary cell wall. *The Plant Journal*, 66 (3): 401-413.

**Browse J.** 2009. The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signalling. *Phytochemistry*, 70 (13-14): 1539-1546.

**Busch AWU & Montgomery BL.** 2015. Interdependence of tetrapyrrole metabolism, the generation of oxidative stress and the mitigative oxidative stress response. *Redox Biology*, 4: 260-271.

**Carpita NC, Ralph J & McCann MC.** 2015. The cell wall. En *Biochemistry & molecular biology of plants*. Eds. Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL. Wiley Blackwell, Oxford (Reino Unido).

**Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T & Raikhel NV.** 2004. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell*, 16 (12): 3285-3303.

**Chang SS, Salmén L, Olsson AM & Clair B.** 2014. Deposition and organisation of cell wall polymers during maturation of poplar tension wood by FTIR microspectroscopy. *Planta*, 239 (1): 243-254.

**Chanliaud E, Burrows KM, Jeronimidis G & Gidley MJ.** 2002. Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. *Planta*, 215 (6): 989-996.

**Chen F, Tobimatsu Y, Havkin-Frenkel D, Dixon RA & Ralph J.** 2012. A polymer of caffeyl alcohol in plant seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (5): 1772-1777.

**Chen L, Carpita NC, Reiter WD, Wilson RH, Jeffries C & McCann MC.** 1998. A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *The Plant Journal*, 16 (3): 385-392.

**Chen SX & Schopfer P.** 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 260 (3): 726-735.

**Chezem WR, Memon A, Li FS, Weng JK & Clay NK.** 2017. SG2-type R2R3-MYB transcription factor MYB15 controls defense-induced lignification and basal immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 29: 1907-1926.

**Choi HW, Kim YJ, Lee SC, Hong JK & Hwang BK.** 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology*, 145: 890-904.

**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 Molecular Biology*, 47 (5): 581-593.

**Christopher LP, Yao B & Ji Y.** 2014. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research*, 2: 12.

**Church DL & Galston AW.** 1988. 4-Coumarate:Coenzyme A ligase and isoperoxidase expression in *Zinnia* mesophyll cells induced to differentiate into tracheary elements. *Plant Physiology*, 88 (3): 679-684.

**Clemente T.** 2006. *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). En *Agrobacterium Protocols*, v.1. Ed. Wang K. *Methods in Molecular Biology*, 343. Humana Press, New Jersey (Estados Unidos).

**Cosio C & Dunand C.** 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60 (2): 391-408.

**Cosio C, Ranocha P, Francoz E, Burlat V, Zheng Y, Perry SE, Ripoll JJ, Yanofsky M & Dunand C.** 2017. The class III peroxidase PRX17 is a direct target of the MADS-box transcription factor AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) and participates in lignified tissue formation. *New Phytologist*, 213: 250-263.

**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 (4): 823-836.

**Courchene CE, Peter GF & Litvay J.** 2006. Cellulose microfibril angle as a determinant of paper strength and hygroexpansivity in *Pinus taeda* L. *Wood and Fiber Science*, 38 (1): 112-120.

**da Costa RMF, Lee SJ, Allison GG, Hazen SP, Winters A & Bosch M.** 2014. Genotype, development and tissue-derived variation of cell-wall properties in the lignocellulosic energy crop *Miscanthus*. *Annals of Botany*, 114 (6): 1265-1277.

**Davidson RM, Reeves PA, Manoslava PM & Leach JE.** 2009. Germins: a diverse protein family important for crop improvement. *Plant Science*, 177: 499-510.

**De Gara L.** 2004. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Reviews*, 3 (1-2): 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. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 173S: S13-S19.

**de Pinto MC, Francis D & De Gara L.** 1999. The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division of tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, 209 (1-2): 90-97.

**de Pinto MC, Tommasi F & De Gara L.** 2000. Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of tobacco Bright Yellow 2. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (7-8): 541-550.

**Delaux PM, Nanda AK, Mathé C, Sejalon-Delmas N & Dunand C.** 2012. Molecular and biochemical aspects of plant terrestrialization. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14 (1): 49-59.

**Demura T, Tashiro G, Horiguchi G, Kishimoto N, Kubo M, Matsuoka N, Minami A, Nagata-Hiwatashi M, Nakamura K, Okamura Y, Sassa N, Suzuki S, Yazaki J, Kikuchi S & Fukuda H.** 2002. Visualization by comprehensive microarray

analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (24): 15794-15799.

**Dische Z.** 1962. Color reactions of carbohydrates. En *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 3: 475-514. Eds. Whistler RL & Wolfrom ML. Academic Press, New York (Estados Unidos).

**Dong W, Kieliszewski M & Held MA.** 2015. Identification of the pI 4,6 extensin peroxidase from *Lycopersicon esculentum* using proteomics and reverse-genomics. *Phytochemistry*, 112: 151-159.

**Duroux L & Welinder KG.** 2003. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *Journal of Molecular Evolution*, 57 (4): 397-407.

**Duwadi K, Chen L, Menassa R & Dhaubhadel S.** 2015. Identification, characterization and down-regulation of *cysteine protease* genes in tobacco for use in recombinant protein production. *PLOS ONE*, 10 (7): e0130556.

**Eberhardt TL, Bernards MA, He L, Davin LB, Wooten JB & Lewis NG.** 1993. Lignification in cell suspension cultures of *Pinus taeda*. *In situ* characterization of a gymnosperm lignin. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (28): 21088-21096.

**Ebringerová A & Heinze T.** 2000. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21 (9): 542-556.

**Edwards KD, Fernandez-Pozo N, Drake-Stowe K, Humphry M, Evans AD, Bombarely A, Allen F, Hurst R, White B, Kernodle SP, Bromley JR, Sanchez-Tamburrino JP, Lewis RS & Mueller LA.** 2017. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genomics*, 18: 448-461.

**El Mansouri I, Mercado JA, Santiago-Dómenech N, Pliego-Alfaro F, Valpuesta V & Quesada MA.** 1999. Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum*, 106: 355-362.

**Elfstrand M, Fossdal CG, Sitbon F, Olsson O, Lönneborg A & von Arnold S.** 2001. Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene *spi 2* in transgenic

Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and reduced growth. *Plant Cell Reports*, 20 (7): 596-603.

**Elfstrand M, Sitbon F, Lapierre C, Bottin A & von Arnold S.** 2002. Altered lignin structure and resistance to pathogens in *spi 2*-expressing tobacco plants. *Planta*, 214: 708-716.

**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 Biology*, 13: 59-68.

**Fahey LM, Nieuwoudt MK & Harris PJ.** 2017. Predicting the cell-wall compositions of *Pinus radiata* (radiata pine) wood using ATR and transmission FTIR spectroscopies. *Cellulose*, 24 (12): 5275-5293.

**Fardet A.** 2017. Plant-foods, cereals, seeds and legumes: the food matrix. NUTREVENT, 19<sup>th</sup> Entretiens de Nutrition de l'Institut Pasteur de Lille, INRA, Lille (Francia).

**Fawal N, Li Q, Savelli B, Brette M, Passaia G, Fabre M, Mahté C & Dunand D.** 2013. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. *Nucleic Acids Research*, 41 (D1): D441-D444.

**Feierabend J.** 2005. Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defense. En *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Ed. Smirnoff N. Blackwell Publishing, Oxford (Reino Unido).

**Fernández-García N, Martí MC, Jiménez A, Sevilla F & Olmos E.** 2009. Sub-cellular distribution of glutathione in an *Arabidopsis* mutant (*vtc1*) deficient in ascorbate. *Journal of Plant Physiology*, 166 (18): 2004-2012.

**Fernández-Pérez F, Pomar F, Pedreño MA & Novo-Uzal E.** 2014. The suppression of *AtPrx52* affects fibers but not xylem lignification in *Arabidopsis* by altering the proportion of syringyl units. *Physiologia Plantarum*, 154 (3): 395-406.

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

**Ferrer JL, Austin MB, Stewart Jr. C & Noel JP.** 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46 (3): 356-370.

**Ferrer MA, Calderón AA, Muñoz R & Ros Barceló A.** 1990. 4-Methoxy- $\alpha$ -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. *Phytochemical Analysis*, 1(2): 63-69.

**Foster CE, Martin TM & Pauly M.** 2010. Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (lignocellulosic biomass) part II: Carbohydrates. *Journal of Visualized Experiments*, 37: e1837.

**Foyer CH & Noctor G.** 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28 (8): 1056-1071.

**Foyer CH & Noctor G.** 2011. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155: 2-18.

**Foyer CH & Noctor G.** 2013. Redox signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18 (16): 2087-2090.

**Francoz E, Ranocha P, Nguyen-Kim H, Jamet E, Burlat V & Dunand C.** 2015. Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry*, 112: 15-21.

**Fry SC.** 2003. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, 161: 641-675.

**Fukuda H.** 1997. Tracheary element differentiation. *The Plant Cell*, 9: 1147-1156.

**Fukuda H & Komamine A.** 1980. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiology*, 65 (1): 57-60.

**Gabaldón C, Gómez-Ros LV, Núñez-Flores MJL, Esteban-Carrasco A & Ros Barceló A.** 2007. Post-translational modifications of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology*, 65 (1-2): 43-61.

**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 Physiology*, 139 (3): 1138-1154.

**Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Merino F, Cuello J, Pedreño MA & Ros Barceló A.** 2006. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. *FEBS Letters*, 580 (18): 4311-4316.



**Gibson LJ.** 2012. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society of Interface*, 9 (76): 2749-2766.

**Gómez-Ros LV, Aznar-Asensio GJ, Hernández JA, Bernal MA, Núñez-Flores MJL, Cuello J & Ros Barceló A.** 2007a. Structural motifs of syringyl peroxidases are conserved during angiosperm evolution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (10): 4131-4138.

**Gómez-Ros LV, Gabaldón C, López Núñez-Flores MJ, Gutiérrez J, Herrero J, Zapata JM, Sottomayor M, Cuello J & Ros Barceló A.** 2012. The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains *cis*-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide. *Planta*, 236: 327-342.

**Gómez-Ros LV, Gabaldón C, Pomar F, Merino F, Pedreño MA & Ros Barceló A.** 2007b. Structural motifs of syringyl peroxidases predate not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. *New Phytologist*, 173 (1): 63-78.

**Grabber JH.** 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science*, 45 (3): 820-831.

**Gutiérrez J, Núñez-Flores MJL, Gómez-Ros LV, Novo Uzal E, Esteban Carrasco A, Díaz J, Sottomayor M, Cuello J & Ros Barceló A.** 2009. Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Planta*, 230: 767-778.

**Hellens R, Mullineaux P & Klee H.** 2000a. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10): 446-451.

**Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM.** 2000b. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42 (6): 819-832.

**Hepworth DG & Vincent JFV.** 1998. The mechanical properties of xylem tissue from tobacco plants (*Nicotiana tabacum* 'Samsun'). *Annals of Botany*, 81 (6): 751-759.

**Herrero J, Esteban Carrasco A & Zapata JM.** 2014. *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis: *In silico* promoter analysis and hormonal regulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 192-202.

**Herrero J, Fernández-Pérez F, Yebra T, Novo-Uzal E, Pomar F, Pedreño MA, Cuello J, Guéra A, Estaban-Carrasco A & Zapata JM.** 2013. Bioinformatic and

functional characterization of the basic peroxidase 72 from *Arabidopsis thaliana* involved in lignin biosynthesis. *Planta*, 237: 1599-1612.

**Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y & Matsui H.** 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 42 (5): 462-468.

**Hobbs SLA, Kpodar P & DeLong CMO.** 1990. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Molecular Biology*, 15 (6): 851-864.

**Houston K, Tucker MR, Chowdhury J, Shirley N & Little A.** 2016. The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7: 984.

**Humphreys JM, Hemm MR & Chapple C.** 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 10045-10050.

**Iiyama K & Wallis AFA.** 1988. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Science and Technology*, 22 (3): 271-280.

**Jackson PAP, Galinha CIR, Pereira CS, Fortunato A, Soares NC, Amâncio SBQ & Ricardo CPP.** 2001. Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiology*, 127 (3): 1065-1076.

**Jaggi M, Kumar S & Sinha AK.** 2011. Overexpression of an apoplastic peroxidase gene *CrPrx* in transgenic hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90 (3): 1005-1016.

**Jamet E, Canut H, Boudart G & Pont-Lezica RF.** 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science*, 11: 33-39.

**Jarvis MC & McCann MC.** 2000. Macromolecular biophysics of the plant cell wall: concepts and methodology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 (1-2): 1-13.

**Kasajima I, Ide Y, Ohkama-Ohtsu N, Hayashi H, Yoneyama T & Fujiwara T.** 2004. A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 49-52.

**Kawaoka A, Matsunaga E, Endo S, Kondo S, Yoshida K, Shinmyo A & Ebinuma H.** 2003. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *Plant Physiology*, 132: 1177-1185.

**Keppler BD & Showalter AM.** 2010. IRX14 and IRX14-LIKE, two glycosyl transferases involved in glucuronoxylan biosynthesis and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 3 (5): 834-841.

**Kersavage PC.** 1973. Moisture content effect on tensile properties of individual Douglas-fir latewood tracheids. *Wood and Fiber*, 5 (2): 105-117.

**Kim D, Langmead B & Salzberg SL.** 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12 (4): 357-360.

**Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur Y, Bang JW & Kwak SS.** 2003. A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plant and cultured cells. *Plant Molecular Biology*, 51 (6): 831-838.

**Kim YH, Kim CY, Song WK, Park DS, Kwon SY, Lee HS, Bang JW & Kwak SS.** 2008. Overexpression of sweetpotato *swpa4* peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. *Planta*, 227 (4): 867-881.

**Kim YH, Park SC, Yun BW & Kwak SS.** 2017. Overexpressing sweetpotato peroxidase gene *swpa4* affects nitric oxide production by activating the expression of reactive oxygen species- and nitric oxide-related genes in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 120: 52-60.

**Kobayashi H & Fukuda H.** 1994. Involvement of calmodulin and calmodulin-binding proteins in the differentiation of tracheary elements in *Zinnia* cells. *Planta*, 194 (3): 388-394.

**Koehler L, Ewers FW & Telewski FW.** 2006. Optimizing for multiple functions: mechanical and structural contributions of cellulose microfibrils and lignin in strengthening tissues. En *Characterization of the cellulosic cell wall*. Eds. Stokke DD & Groom LH. Blackwell Publishing, Ames - Iowa (Estados Unidos).

**Koutaniemi S, Warinowski T, Kärkönen A, Alatalo E, Fossdal CG, Saranpää P, Laakso T, Fagerstedt KV, Simola LK, Paulin L, Rudd S & Teeri TH.** 2007.

Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Molecular Biology*, 65 (3): 311-328.

**Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H & Demura T.** 2005. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & Development*, 19: 1855-1860.

**Kumar M & Turner S.** 2015. Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms. *Phytochemistry*, 112: 91-99.

**Kumar S, Jaggi M & Sinha AK.** 2012. Ectopic overexpression of vacuolar and apoplastic *Catharanthus roseus* peroxidases confers differential tolerance to salt and dehydration stress in transgenic tobacco. *Protoplasma*, 249 (2): 423-432.

**Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

**Lagrimini LM, Gingas V, Finger F, Rothstein S & Liu TTY.** 1997. Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiology*, 114: 1187-1196.

**Laugesen S, Bak-Jensen KS, Hägglund P, Henriksen A, Finnie C, Svensson B & Roepstorff P.** 2007. Barley peroxidase isozymes: expression and post-translational modification in mature seeds as identified by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 268 (2-3): 244-253.

**Lee C, Teng Q, Zhong R, Yuan Y, Haghghat M & Ye ZH.** 2012. Three Arabidopsis DUF579 domain-containing GXM proteins are methyltransferases catalyzing 4-*O*-methylation of glucuronic acid on xylan. *Plant & Cell Physiology*, 53 (11): 1934-1949.

**Lee Y, Rubio MC, Alassimone J & Geldner N.** 2013. A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell*, 153 (2): 402-412.

**Li S, Lei L, Yingling YG & Gu Y.** 2015. Microtubules and cellulose biosynthesis: the emergence of new players. *Current Opinion in Plant Biology*, 28: 76-82.

**Li Y, Kajita S, Kawai S, Katayama Y & Morohoshi N.** 2003a. Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. *Journal of Plant Research*, 116 (3): 175-182.

**Li Y, Qian Q, Zhou Y, Yan M, Sun L, Zhang M, Fu Z, Wang Y, Han B, Pang X, Chen M & Li J.** 2003b. *BRITTLE CULM1*, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants. *The Plant Cell*, 15 (9): 2020-2031.

**Liszkay 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 (4): 658-667.

**Liu L, Shang-Guan K, Zhang B, Liu X, Yan M, Zhang L, Shi Y, Zhang M, Qian Q, Li J & Zhou Y.** 2013. Brittle culm1, a COBRA-like protein, functions in cellulose assembly through binding cellulose microfibrils. *PLOS Genetics*, 9 (8): e1003704.

**Locato V, Gadaleta C, De Gara L & de Pinto MC.** 2008. Production of reactive species and modulation of antioxidant network in response to heat shock: a critical balance for cell fate. *Plant, Cell and Environment*, 31 (11): 1606-1619.

**Longu S, Medda R, Padiglia A, Pedersen JZ & Floris G.** 2004. The reaction mechanism of plant peroxidases. *The Italian Journal of Biochemistry*, 53 (1): 42-46.

**López Núñez-Flores MJ, Gutiérrez J, Gómez-Ros LV, Novo Uzal E, Sottomayor M & Ros Barceló A.** 2010. Downregulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans* by gibberellic acid. *Journal of Integrative Biology*, 52 (2): 244-251.

**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. *Journal of Experimental Botany*, 55 (396): 423-431.

**Lupoi JS, Singh S, Davis M, Lee DJ, Shepherd M, Simmons BA & Henry RJ.** 2014. High-throughput prediction of eucalypt lignin syringyl/guaiacyl content using multivariate analysis: a comparison between mid-infrared, near-infrared, and Raman spectroscopies for model development. *Biotechnology for Biofuels*, 7: 93.

**Ma X, Qiao Z, Chen D, Yang W, Zhou R, Zhang W & Wang M.** 2015. CYCLIN-DEPENDENT KINASE G2 regulates salinity stress response and salt mediated flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 88 (3): 287-299.

**MacMillan CP, Mansfield SD, Starchurski ZH, Evans R & Southerton SG.** 2010. Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics

and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *The Plant Journal*, 62 (4): 689-703.

**Maeda H & Dudareva N.** 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 73-105.

**Margis R, Dunand C, Teixeira FK & Margis-Pinheiro M.** 2008. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *FEBS Journal*, 275: 3959-3970.

**Marjamaa K, Kukkola E, Lundell T, Karhunen P, Saranpää P & Fagerstedt KV.** 2006. Monolignol oxidation by xylem peroxidase isoforms of Norway spruce (*Picea abies*) and silver birch (*Betula pendula*). *Tree Physiology*, 26: 605-611.

**Marjamaa K, Kukkola EM & Fagerstedt KV.** 2009. The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*, 60 (2): 367-376.

**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.

**Martone PT, Estevez JM, Lu F, Ruel K, Denny MW, Somerville C & Ralph J.** 2009. Discovery of lignin seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Current Biology*, 19 (2): 169-175.

**Mathieu M, Lelu-Walter MA, Blervacq AS, David H, Hawkins S & Neutelings G.** 2006. Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers. *Plant Molecular Biology*, 61 (4-5): 615-627.

**Matsui T, Tabayashi A, Iwano M, Shinmyo A, Kato K & Nakayama H.** 2011. Activity of the C-terminal-dependent vacuolar sorting signal of horseradish peroxidase C1a is enhanced by its secondary structure. *Plant & Cell Physiology*, 52 (2): 413-420.

**McCann MC, Chen L, Roberts K, Kemsley EK, Sene C, Carpita NC, Stacey NJ & Wilson RH.** 1997. Infrared microspectroscopy: sampling heterogeneity in plant cell wall composition and architecture. *Physiologia Plantarum*, 100 (3): 729-738.

**McFarlane HE, Döring A & Persson S.** 2014. The cell biology of cellulose synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 65: 69-94.

**McNamara JT, Morgan JLW & Zimmer J.** 2015. A molecular description of cellulose biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 84: 895-921.

**Meents MJ, Watanabe Y & Samuels AL.** 2018. The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. *Annals of Botany*, 121 (6): 1107-1125.

**Mélida H, Largo-Gosens A, Novo-Uzal E, Santiago R, Pomar F, García P, García-Angulo P, Acebes JL, Álvarez J & Encina A.** 2015. Ectopic lignification in primary cellulose-deficient cell walls of maize cell suspension cultures. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57 (4): 357-372.

**Menden B, Kohlhoff M & Moerschbacher BM.** 2007. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry*, 68 (4): 513-520.

**Merchante C, Stepanova AN & Alonso JM.** 2017. Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *The Plant Journal*, 90 (4): 628-653.

**Miao YC & Liu CJ.** 2010. ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (52): 22728-22733.

**Miedes E, Vanholme R, Boerjan W & Molina A.** 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5: 358.

**Minibayeva F, Beckett RP & Kranner I.** 2015. Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. *Phytochemistry*, 112: 122-129.

**Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K & Ohme-Takagi M.** 2005. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *The Plant Cell*, 17 (11): 2993-3006.

**Morita Y, Mikami B, Yamashita H, Lee JY, Aibara S, Sato M, Katsube Y & Takana N.** 1991. Primary and crystal structures of horseradish peroxidase isozyme E5. En *Biochemical, molecular, and physiological aspects of plant peroxidases: 81-88*. Eds. Lobarzewski J, Greppin H, Penel C & Gaspar T. University of Geneva, Geneva (Suiza).

**Mortimer JC, Miles GP, Brown DM, Zhang Z, Segura MP, Weimar T, Yu X, Seffen KA, Stephens E, Turner SR & Dupree P.** 2010. Absence of branches from xylan in *Arabidopsis gux* mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (40): 17409-17414.

**Mottiar Y, Vanholme R, Boerjan W, Ralph J & Mansfield SD.** 2016. Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification. *Current Opinion in Biotechnology*, 37: 190-200.

**Moura JCMS, Bonine CAV, de Oliveira Fernandes Viana J, Dornelas MC & Mazzafera P.** 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (4): 360-376.

**Murashige T & Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

**Muscolo A, Sidari M & Panuccio MR.** 2003. Tolerance of kikuyu grass to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Growth Regulation*, 41 (1): 57-62.

**Novo Uzal E, Gómez Ros LV, Pomar F, Bernal MA, Paradela A, Albar JP & Ros Barceló A.** 2009. The presence of sinapyl lignin in *Ginkgo biloba* cell cultures changes our views of the evolution of lignin biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 135 (2): 196-213.

**Novo-Uzal E, Gutiérrez J, Martínez-Cortés T & Pomar F.** 2014. Molecular cloning of two novel peroxidases and their response to salt stress and salicylic acid in the living fossil *Ginkgo biloba*. *Annals of Botany*, 114 (5): 923-936.

**Oakley BR, Kirsch DR & Morris NR.** 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 105 (1): 361-363.

**Odell JT, Nagy F & Chua NH.** 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313: 810-812.

**Oliva M, Theiler G, Zámocky M, Koua D, Margis-Pinheiro M, Passardi F & Dunand C.** 2009. PeroxiBase: a powerful tool to collect and analyse peroxidase sequences from Viridiplantae. *Journal of Experimental Botany*, 60 (2): 453-459.

**Østergaard L, Teilmann 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 Molecular Biology*, 44 (2): 231-243.



**Passardi F, Bakalovic N, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M, Penel C & Dunand C.** 2007. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics*, 89 (5): 567-579.

**Passardi F, Cosio C, Penel C & Dunad C.** 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24 (5): 255-265.

**Passardi F, Longet D, Penel C & Dunand C.** 2004a. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65 (13): 1879-1893.

**Passardi F, Penel C & Dunand C.** 2004b. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9 (11): 534-540.

**Passardi F, Tognolli M, De Meyer M, Penel C & Dunand C.** 2006. Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta*, 223: 965-974.

**Pedreira J, Herrera MT, Zarra I & Revilla G.** 2011. The overexpression of *AtPrx37*, an apoplastic peroxidase, reduces growth in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 141 (2): 177-187.

**Pereira L, Domingues-Junior AP, Jansen S, Choat B & Mazzafera P.** 2018. Is embolism resistance in plant xylem associated with quantity and characteristics of lignin? *Trees*, 32 (2): 349-358.

**Persson S, Wei H, Milne J, Page GP & Somerville CR.** 2005. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (24): 8633-8638.

**Pertea M, Kim D, Pertea G, Leek JT & Salzberg SL.** 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-Seq experiments with HISAT, StringTie, and Ballgown. *Nature Protocols*, 11 (9): 1650-1667.

**Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT & Salzberg SL.** 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-Seq reads. *Nature Biotechnology*, 33 (3): 290-295.

**Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): 2002-2007.

**Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD & Foyer CH.** 2003. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology*, 132 (3): 1631-1641.

**Pignocchi C & Foyer CH.** 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (4): 379-389.

**Placet V, Trivaudey F, Cisse O, Gucheret-Retel V & Boubakar ML.** 2012. Diameter dependence of the apparent tensile modulus of hemp fibres: A morphological, structural or ultrastructural effect? *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 43 (2): 275-287.

**Pollegioni L, Tonin F & Rosini E.** 2015. Lignin-degrading enzymes. *The FEBS Journal*, 282 (7): 1190-1213.

**Pomar F, Merino F & Ros Barceló A.** 2002. *O*-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma*, 220 (1-2): 17-28.

**Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van der Peer Y & Boerjan W.** 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133 (3): 1051-1071.

**Ralph J, Brunow G & Boerjan W.** 2007. Lignins. En *eLS: Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester (Reino Unido).

**Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH & Boerjan W.** 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3 (1-2): 29-60.

**Rayón Encinas E, López Martínez J & Arrieta MP.** 2013. Mechanical characterization of microlaminar structures extracted from cellulosic material using nanoindentation technique. *Cellulose Chemistry and Technology*, 47 (5-6): 345-351.

**Reichert AI, He XZ & Dixon RA.** 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco *PAL* genes and active heterotetrameric enzymes. *Biochemical Journal*, 424 (2): 233-242.

**Ren LL, Liu YJ, Liu HJ, Qian TT, Qi LW, Wang XR & Zeng QY.** 2014. Subcellular relocalization and positive selection play key roles in the retention of duplicate genes of *Populus* class III peroxidase family. *The Plant Cell*, 26 (6): 2404-2419.

**Rolando C, Monties B & Lapierre C.** 1992. Thioacidolysis. En *Methods in lignin chemistry*: 334-349. Eds. Lin SY & Dence CW. Springer-Verlag, Berlín Heidelberg (Alemania).

**Ros Barceló A.** 1997. Lignification in plant cell walls. *International Review of Cytology*, 176: 87-132.

**Ros Barceló A.** 1998. The generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta*, 207 (2): 207-216.

**Ros Barceló A.** 2005. Xylem parenchyma cells deliver the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta*, 220 (5): 747-756.

**Ros Barceló A & Aznar-Asensio GJ.** 2002. Basic peroxidases in cell walls of plants belonging to the *Asteraceae* family. *Journal of Plant Physiology*, 159: 339-345.

**Ros Barceló A & Pomar F.** 2001. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. *Phytochemistry*, 57 (7): 1105-1113.

**Ros Barceló A, Gómez Ros LV & Esteban Carrasco A.** 2007. Looking for syringyl peroxidases. *Trends in Plant Science*, 12 (11): 486-491.

**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? *Phytochemistry Reviews*, 3 (1-2): 61-78.

**Ros Barceló A, Morales M, Pedreño MA.** 1998. Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. En *American Chemical Society Symposium Series – Lignin and Lignan Biosynthesis*, 697: 84-95. Eds. Lewis NG & Sarkanen S. American Chemical Society, Washinton DC (Estados Unidos).

**Ros-Barceló A, Pomar F, López-Serrano M, Martínez P & Pedreño MA.** 2002a. Developmental regulation of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (4): 325-332.

**Ros Barceló A, Pomar F & Pedreño MA.** 2000. Competitive inhibitor-dissected histochemistry of the peroxidase responsible for syringyl lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* xylem. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27 (12): 1101-1107.

**Ros Barceló A, Pomar F, Ferrer MA, Martínez P, Ballesta MC, & Pedreño MA.** 2002b. *In situ* characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiologia Plantarum*, 114 (1): 33-40.

**Rose AS, Bradley AR, Valasatava Y, Duarte JM, Prlić A & Rose PW.** 2018. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, bty419. PDB ID: 1SCH. En *The Protein Data Bank*. Aut. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN & Bourne PE. 2000. *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.

**Saeman JF, Moore WE & Millet MA.** 1963. Sugar units present. Hydrolysis and quantitative paper chromatography. En *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 3: 54-69. Eds. Whistler RL & Wolfrom ML. Academic Press, New York (Estados Unidos).

**Salmén L & Bergström E.** 2009. Cellulose structural arrangement in relation to spectral changes in tensile loading FTIR. *Cellulose*, 16: 975-982.

**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 Molecular Biology*, 62: 797-807.

**Sasaki S, Nishida T, Tsutsumi Y & Kondo R.** 2004. Lignin dehydrogenative polymerization mechanism: a poplar cell wall peroxidase directly oxidizes polymer lignin and produces in vitro dehydrogenative polymer rich in  $\beta$ -O-4 linkage. *FEBS Letters*, 562 (1-3): 197-201.

**Sato Y, Demura T, Yamawaki K, Inoue Y, Sato S, Sugiyama M & Fukuda H.** 2006. Isolation and characterization of a novel peroxidase gene *ZPO-C* whose expression and function are closely associated with lignification during tracheary element differentiation. *Plant Cell Physiology*, 47 (4): 493-503.

**Schmidt GW & Delaney SK.** 2010. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 283 (3): 233-241.

**Schmidt M, Dehne S & Feierabend J.** 2002. Post-transcriptional mechanisms control catalase synthesis during its light-induced turnover in rye leaves through the availability of the heme cofactor and reversible changes of the translation efficiency of mRNA. *The Plant Journal*, 31(5): 601-613.

**Schopfer P.** 2001. Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal*, 28 (6): 679-688.

**Schopfer P, Liskay A, Bechtold M, Frahry G & Wagner A.** 2002. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, 214: 821-828.

**Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S & Schmidt R.** 2004. Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *The Plant Cell*, 16 (10): 2561-2572.

**Schuller DJ, Ban N, van Huystee RB, McPherson A & Poulos TL.** 1996. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4 (3): 311-321.

**Scully ED, Donze-Reiner T, Wang H, Eickhoff TE, Baxendale F, Twigg P, Kovacs F, Heng-Moss T, Sattler SE & Sarath G.** 2016. Identification of an orthologous clade of peroxidases that respond to feeding by greenbugs (*Schizaphis graminum*) in *C4* grasses. *Functional Plant Biology*, 43 (12): 1134-1148.

**Shan C, Zhang S & Ou X.** 2018. The roles of H<sub>2</sub>S and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in regulating AsA-GSH cycle in the leaves of wheat seedlings under drought stress. *Protoplasma*, 255 (4): 1257-1262.

**Shigeto J & Tsutsumi Y.** 2016. Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytologist*, 209 (4): 1395-1402.

**Shigeto J, Itoh Y, Hirao S, Ohira K, Fujita K & Tsutsumi Y.** 2015. Simultaneously disrupting *AtPrx2*, *AtPrx25* and *AtPrx71* alters lignin content and structure in *Arabidopsis* stem. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57 (4): 349-356.

**Simões I & Faro C.** 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 271: 2067-2075.

**Siqueira G, Bras J & Dufresne A.** 2010. Cellulosic bionanocomposites: a review of preparation, properties and applications. *Polymers*, 2 (4): 728-765.

**Smith RA, Schuetz M, Karlen SD, Bird D, Tokunaga N, Sato Y, Mansfield SD, Ralph J & Samuels AL.** 2017. Defining the diverse cell populations contributing to lignification in *Arabidopsis* stem. *Plant Physiology*, 174 (2): 1028-1036.

**Smith RA, Schuetz M, Roach M, Mansfield SD, Ellis B & Samuels L.** 2013. Neighboring parenchyma cells contribute to *Arabidopsis* xylem lignification, while

lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. *The Plant Cell*, 25 (10): 3988-3999.

**Sperry JS.** 2003. Evolution of water transport and xylem structure. *International Journal of Plant Sciences*, 164 (S3): S115-S127.

**Stewart JJ, Akiyama T, Chapple C, Ralph J & Mansfield SD.** 2009. The effects on lignin structure of overexpression of ferulate 5-hydroxylase in hybrid poplar. *Plant Physiology*, 150 (2): 621-635.

**Stitz M, Gase K, Baldwin IT & Gaquerel E.** 2011. Ectopic expression of *AtJMT* in *Nicotiana attenuata*: creating a metabolic sink has tissue-specific consequences for the jasmonate metabolic network and silences downstream gene expression. *Plant Physiology*, 157 (1): 341-354.

**Strivastava LM.** 1966. Histochemical studies on lignin. *Tappi* 49: 173-183.

**Szymanska-Cargot M & Zdunek A.** 2013. Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food Biophysics*, 8 (1): 29-42.

**Takahashi K, Niwa H, Yokota N, Kubota K & Inoue H.** 2008. Widespread tissue expression of nepenthesin-like aspartic protease genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (7): 724-729.

**Taylor-Teeples M, Lin L, de Lucas M, Turco G, Toal TW, Gaudinier A, Young NF, Trabucco GM, Veling MT, Lamothe R, Handakumbura PP, Xiong G, Wang C, Corwin J, Tsoukalas A, Zhang L, Ware D, Pauly M, Kliebenstein DJ, Dehesh K, Tagkopoulos I, Breton G, Pruneda-Paz JL, Ahnert SE, Kay SA, Hazen SP & Brady SM.** 2015. *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*, 517: 571-575.

**Tenhaken R.** 2015. Cell wall remodelling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 5: 771.

**Tian S, Wang X, Li P, Wang H, Ji H, Xie J, Qiu Q, Shen D & Dong H.** 2016. Plant aquaporin AtPIP1;4 links apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction to disease immunity pathways. *Plant Physiology*, 171 (3): 1635-1650.

**Tobimatsu Y, Wagner A, Donaldson L, Mitra P, Niculaes C, Dima O, Kim JI, Anderson N, Loque D, Boerjan W, Chapple C & Ralph J.** 2013. Visualization of plant

cell wall lignification using fluorescence-tagged monolignols. *The Plant Journal*, 76 (3): 357-366.

**Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R & Fernie AR.** 2013. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science*, 4: 62.

**Türker-Kaya S & Huck CW.** 2017. A review of mid-infrared and near-infrared imaging: principles, concepts and applications in plant tissue analysis. *Molecules*, 22 (1): 168.

**Tzin V & Galili G.** 2010. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant*, 3 (6): 956-972.

**Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M & Rozen SG.** 2012. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40 (15): e115.

**Updegraff DM.** 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry*, 32: 420-424.

**Vanholme R, Cesarino I, Rataj K, Xiao Y, Sundin L, Goeminne G, Kim H, Cross J, Morreel K, Araujo P, Welsh L, Hastraete J, McClellan C, Vanholme B, Ralph J, Simpson GG, Halpin C & Boerjan W.** 2013. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Science*, 341 (6150): 1103-1106.

**Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J & Boerjan W.** 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153 (3): 895-905.

**Vatulescu AD, Fortunato AS, Sá MC, Amâncio S, Ricardo CPP & Jackson PA.** 2004. Cloning and characterisation of a basic IAA oxidase associated with root induction in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42 (7-8): 609-615.

**Vermerris W & Abril A.** 2015. Enhancing cellulose utilization for fuels and chemicals by genetic modification of plant cell wall architecture. *Current Opinion in Biotechnology*, 32: 104-112.

**Voelker SL, Lachenbruch B, Meinzer FC, Kitin P & Strauss SH.** 2011. Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival. *Plant, Cell & Environment*, 34: 655-668.

**Volkman D & Baluška F.** 2006. Gravity: one of the driving forces for evolution. *Protoplasma*, 229 (2-4): 143-148.

**Wagner A, Tobimatsu Y, Phillips L, Flint H, Geddes B, Lu F & Ralph J.** 2015. Syringyl lignin production in conifers: proof of concept in a pine tracheary element system. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 112 (19): 6218-6223.

**Wakabayashi K, Soga K & Hoson T.** 2012. Phenylalanine ammonia-lyase and cell wall peroxidase are cooperatively involved in the extensive formation of ferulate network in cell walls of developing rice shoots. *Journal of Plant Physiology*, 169 (3): 262-267.

**Wang J, Zhu J, Huang RZ & Yang YS.** 2012. Investigation of cell wall composition related to stem lodging resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) by FTIR spectroscopy. *Plant Signaling & Behavior*, 7 (7): 856-863.

**Wang Y, Bouchabke-Coussa O, Lebris P, Antelme S, Soulhat C, Gineau E, Dalmais M, Bendahmane A, Morin H, Mouille G, Legée F, Cézard L, Lapierre C & Sibout R.** 2015. LACCASE5 is required for lignification of the *Brachypodium distachyon* Culm. *Plant Physiology*, 168 (1): 192-204.

**Watanabe L, Ribeiro de Moura P, Bleicher L, Nascimento AS, Zamorano LS, Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Bursakov S, Roig MG, Shnyrov VL & Polikarpov I.** 2010. Crystal structure and statistical coupling analysis of high glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *Journal of Structural Biology*, 169: 226-242.

**Welinder KG.** 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2 (3): 388-393.

**Welinder KG, Justesen AF, Kjærsgård IHV, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM & Duroux L.** 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 269: 6063-6081.

**Welinder KG, Mauro JM & Nørskov-Lauritsen L.** 1992. Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochemical Society Transactions*, 20 (2): 337-340.

**Weng JK & Chapple C.** 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187 (2): 273-285.

**Weng JK, Li X, Stout J & Chapple C.** 2008. Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (22): 7887-7892.



**Wise AA, Liu Z & Binns AN.** 2006. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. En *Agrobacterium Protocols, 1: 43-54*. Ed. Wang K. Methods in Molecular Biology, 343, Humana Press, New Jersey (Estados Unidos).

**Wrigley CW.** 1971. Gel electrofocusing. *Methods of Enzymology*, 22: 559-564.

**Wu J, Wang L & Baldwin IT.** 2008. Mehtyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA? *Planta*, 227 (5): 1161-1168.

**Wu Y, Yang Z, How J, Xu H, Chen L & Li K.** 2017. Overexpression of a peroxidase gene (*AtPrx64*) of *Arabidopsis thaliana* in tobacco improves plant's tolerance to aluminium stress. *Plant Molecular Biology*, 95 (1-2): 157-168.

**Xu B, Ohtani M, Yamaguchi M, Toyooka K, Wakazaki M, Sato M, Kubo M, Nakano Y, Sano R, Hiwatashi Y, Murata T, Kurata T, Yoneda A, Kato K, Hasebe M & Demura T.** 2014. Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land. *Science*, 343 (6178): 1505-1508.

**Xu Z, Zhang D, Hu J, Zhou X, Ye X, Reichel KL, Stewart NR, Syrenne RD, Yang X, Gao P, Shi W, Doepcke C, Sykes RW, Burris JN, Bozell JJ, Cheng MZM, Hayes DG, Labbe N, Davis M, Stewart Jr CN & Yuan JS.** 2009. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics*, 10 (S11): S3.

**Yang F, Mitra P, Zhang L, Prak L, Verhertbruggen Y, Kim JS, Sun L, Zheng K, Tang K, Auer M, Scheller HV & Loqué D.** 2013. Engineering secondary cell wall deposition in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 11: 325-335.

**Yokota K & Yamazaki I.** 1965. Reaction of peroxidase with reduced nicotinamide-adenine dinucleotide and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology and Biological Oxidation*, 105 (2): 301-312.

**Yoo CG, Dumitrache A, Muchero W, Natzke J, Akinosho H, Li M, Sykes RW, Brown SD, Davison B, Tuskan GA, Pu Y & Ragauskas AJ.** 2018. Significance of lignin S/G ratio in biomass recalcitrance of *Populus trichocarpa* variants for bioethanol production. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6 (2): 2162-2168.

**Yue F, Lu F, Sun RC & Ralph J.** 2011. Syntheses of lignin-derived thioacidolysis monomers and their uses as quantitation standards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 922-928.

**Zámocky M & Obinger C.** 2010. Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. En *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*. Eds. Torres E & Ayala M. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg (Alemania).

**Zhang Y, Yang R, Wu Y, Wang S, Liu C, Zhong X & Wu J.** 2015. Effect of growth period on cell wall mechanical properties of elephant grass. *BioResources*, 10 (3): 4252-4262.

**Zhao Q.** 2016. Lignification: flexibility, biosynthesis and regulation. *Trends in Plant Science*, 21 (8): 713-721.

**Zhao Q, Nakashima J, Chen F, Yin Y, Fu C, Yun J, Shao H, Wang X, Wang ZY & Dixon RA.** 2013. LACCASE is necessary and nonredundant with PEROXIDASE for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25 (10): 3976-3987.

**Zhao X, Zhang L & Liu D.** 2012. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 6 (5): 561-579.

**Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarth RL & Ye ZH.** 2008. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20 (10): 2763-2782.

**Zhong R, Richardson EA & Ye ZH.** 2007. Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Planta*, 225 (6): 1603-1611.

**Zhong R & Ye ZH.** 2009. Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signaling & Behavior*, 4 (11): 1028-1034.

**Zhong R & Ye ZH.** 2014. Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis. *Plant Science*, 229: 193-207.

**Zhong R & Ye ZH.** 2015. Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant and Cell Physiology*, 56 (2): 195-214.

**Zhou G, Taylor G & Polle A.** 2011. FTIR-ATR-based prediction and modelling of lignin and energy contents reveals independent intra-specific variation of these traits in bioenergy poplars. *Plant Methods*, 7: 9.



## ***A. ANEXOS***

---



Plásmido AJ880392 AJ880393 AJ880394 AJ880395	1 atgagttatcataagtcaagtggaaactatattaatggttcctctatttatggtacttatatcagtgaact atgagttatcataagtcaagtggaaactatattaatggttcctctatttatggtacttatatcagtgaact atgagttatcataagtcaagtggaaactatattaatggttcctctatttatggtacttatatcagtgaact atgagttatcataagtcaagtggaaactatattaatggttcctctatttatggtacttatatcagtgaact atgagttatcataagtcaagtggaaactatattaatggttcctctatttatggtacttatatcagtgaact
Plásmido AJ880392 AJ880393 AJ880394 AJ880395	71 acttcatgtcatgtaacgctcagttgtcaaccaccttttaogatactacatgcctactgcactttcaac acttcatgtcatgtaacgctcagttgtcaaccaccttttaogatactacatgcctactgcactttcaac acttcatgtcatgtaacgctcagttgtcaaccaccttttaogatactacatgcctactgcactttcaac acttcatgtcatgtaacgctcagttgtcaaccaccttttaogatactacatgcctactgcactttcaac acttcatgtcatgtaacgctcagttgtcaaccaccttttaogatactacatgcctactgcactttcaac
Plásmido AJ880392 AJ880393 AJ880394 AJ880395	141 cattogaacttctatcagaagttcgggttcaagcaacogtgcgaatgcagccttgggtcattgccttctt cattogaacttctatcagaagttcgggttcaagcaacogtgcgaatgcagccttgggtcattgccttctt cattogaacttctatcagaagttcgggttcaagcaacogtgcgaatgcagccttgggtcattgccttctt cattogaacttctatcagaagttcgggttcaagcaacogtgcgaatgcagccttgggtcattgccttctt cattogaacttctatcagaagttcgggttcaagcaacogtgcgaatgcagccttgggtcattgccttctt
Plásmido AJ880392 AJ880393 AJ880394 AJ880395	211 tttaacgattggtttggtcagggatgcatgctctcttttgctatcaggtgctggttagtgagagggcat tttaacgattggtttggtcagggatgcatgctctcttttgctatcaggtgctggttagtgagagggcat tttaacgattggtttggtcagggatgcatgctctcttttgctatcaggtgctggttagtgagagggcat tttaacgattggtttggtcagggatgcatgctctcttttgctatcaggtgctggttagtgagagggcat tttaacgattggtttggtcagggatgcatgctctcttttgctatcaggtgctggttagtgagagggcat
Plásmido AJ880392 AJ880393 AJ880394 AJ880395	281 cacctgccaatgatggtgtggtgggctatgaagttatagatgcccgaagctgcggttgaaaggggtgtg cacctgccaatgatggtgtggtgggctatgaagttatagatgcccgaagctgcggttgaaaggggtgtg cacctgccaatgatggtgtggtgggctatgaagttatagatgcccgaagctgcggttgaaaggggtgtg cacctgccaatgatggtgtggtgggctatgaagttatagatgcccgaagctgcggttgaaaggggtgtg cacctgccaatgatggtgtggtgggctatgaagttatagatgcccgaagctgcggttgaaaggggtgtg
Plásmido AJ880392 AJ880393 AJ880394 AJ880395	351 tcctggagttggttcgtgtgctgatatactcgggttgcagctcgtgatgcttcagttcgggttgggtggg tcctggagttggttcgtgtgctgatatactcgggttgcagctcgtgatgcttcagttcgggttgggtggg tcctggagttggttcgtgtgctgatatactcgggttgcagctcgtgatgcttcagttcgggttgggtggg tcctggagttggttcgtgtgctgatatactcgggttgcagctcgtgatgcttcagttcgggttgggtggg tcctggagttggttcgtgtgctgatatactcgggttgcagctcgtgatgcttcagttcgggttgggtggg
Plásmido AJ880392 AJ880393 AJ880394 AJ880395	421 ccgtcatggacagtaagacttggagaagagatctacaacttogaacgcccacacagcogcaactgatc ccgtcatggacagtaagacttggagaagagatctacaacttogaacgcccacacagcogcaactgatc ccgtcatggacagtaagacttggagaagagatctacaacttogaacgcccacacagcogcaactgatc ccgtcatggacagtaagacttggagaagagatctacaacttogaacgcccacacagcogcaactgatc ccgtcatggacagtaagacttggagaagagatctacaacttogaacgcccacacagcogcaactgatc
Plásmido AJ880392 AJ880393 AJ880394 AJ880395	481 ttccaagaggggaacatggttttaagtcaacttattagtaactttgccaataaagggactcaacacaagaga ttccaagaggggaacatggttttaagtcaacttattagtaactttgccaataaagggactcaacacaagaga ttccaagaggggaacatggttttaagtcaacttattagtaactttgccaataaagggactcaacacaagaga ttccaagaggggaacatggttttaagtcaacttattagtaactttgccaataaagggactcaacacaagaga ttccaagaggggaacatggttttaagtcaacttattagtaactttgccaataaagggactcaacacaagaga
Plásmido AJ880392 AJ880393 AJ880394 AJ880395	551 aatggtgccttatcaggtctcacacactcggtcagggcagatgataaaggttcaggggaaggatatac aatggtgccttatcaggtctcacacactcggtcagggcagatgataaaggttcaggggaaggatatac aatggtgccttatcaggtctcacacactcggtcagggcagatgataaaggttcaggggaaggatatac aatggtgccttatcaggtctcacacactcggtcagggcagatgataaaggttcaggggaaggatatac aatggtgccttatcaggtctcacacactcggtcagggcagatgataaaggttcaggggaaggatatac

**Figura A.2. Alineamiento de la secuencia de ZePrx.** Alineamiento de la secuencia insertada en el plásmido pGreen II 0179 (Plásmido) con las distintas isoformas clonadas por Gabaldón *et al.* (2005): AJ880392, AJ880393, AJ880394 y AJ880395. Se muestra la región entre las posiciones 1 y 620 de la ORF. En fondo verde se muestran las diferencias detectadas entre las secuencias de referencia. En fondo rosa se muestran las diferencias detectadas entre las secuencias de referencia y la clonada en el plásmido.

## Caracterización funcional de la última etapa de la biosíntesis de ligninas mediante la sobreexpresión de peroxidasas en plantas modelo

Plásmido	1	msyhkssgtilmvplfmlisvnyfmscnaqlsttfydttcptalstirtsirssvssnrrnaalvirll
AJ880392	1	msyhkssgtilmvplfmlisvnyfmscnaqlsttfydttcptalstirtsirssvssnrrnaalvirll
AJ880393	1	msyhkssgtilmvplfmlisvnyfmscnaqlsttfydttcptalstirtsirssvssnrrnaalvirll
AJ880394	1	msyhkssgtilmvplfmlisvnyfmscnaqlsttfydttcptalstirtsirssvssnrrnaalvirll
AJ880395	1	msyhkssgtilmvplfmlisvnyfmscnaqlsttfydttcptalstirtsirssvssnrrnaalvirll
Plásmido	71	fhdcfvqgdcaslllsgagseraspandgvlgyevidaakaavervcpgvvscadilavaardasvavgg
AJ880392	71	fhdcfvqgdcaslllsgagseraspandgvlgyevidaakaavervcpgvvscadilavaardasvavgg
AJ880393	71	fhdcfvqgdcaslllsgagseraspandgvlgyevidaakaavervcpgvvscadilavaardasvavgg
AJ880394	71	fhdcfvqgdcaslllsgagseraspandgvlgyevidaakaavervcpgvvscadilavaardasvavgg
AJ880395	71	fhdcfvqgdcaslllsgagseraspandgvlgyevidaakaavervcpgvvscadilavaardasvavgg
Plásmido	141	pswtvrlgrrdsttsnaaqaatdlprgmmvlsqllisnfankglntremvalsgshtlgqarcirfrgriy
AJ880392	141	pswtvrlgrrdsttsnaaqaatdlprgmmvlsqllisnfankglntremvalsgshtlgqarcirfrgriy
AJ880393	141	pswtvrlgrrdsttsnaaqaatdlprgmmvlsqllisnfankglntremvalsgshtlgqarcirfrgriy
AJ880394	141	pswtvrlgrrdsttsnaaqaatdlprgmmvlsqllisnfankglntremvalsgshtlgqarcirfrgriy
AJ880395	141	pswtvrlgrrdsttsnaaqaatdlprgmmvlsqllisnfankglntremvalsgshtlgqarcirfrgriy
Plásmido	211	nstlriepnfnrslsqacpptgndatlrpldlvtpnsfdnnyrnlvtsrgllisdqvlfnadstdsivt
AJ880392	211	nstlriepnfnrslsqacpptgndatlrpldlvtpnsfdnnyrnlvtsrgllisdqvlfnadstdsivt
AJ880393	211	nstlriepnfnrslsqacpptgndatlrpldlvtpnsfdnnyrnlvtsrgllisdqvlfnadstdsivt
AJ880394	211	nstlriepnfnrslsqacpptgndatlrpldlvtpnsfdnnyrnlvtsrgllisdqvlfnadstdsivt
AJ880395	211	nstlriepnfnrslsqacpptgndatlrpldlvtpnsfdnnyrnlvtsrgllisdqvlfnadstdsivt
Plásmido	281	eyvnnpatfaadfaaamvkmseigvvtgtsgivrtlognps
AJ880392	281	eyvnnpatfaadfaaamvkmseigvvtgtsgivrtlognps
AJ880393	281	eyvnnpatfaadfaaamvkmseigvvtgtsgivrtlognps
AJ880394	281	eyvnnpatfaadfaaamvkmseigvvtgtsgivrtlognps
AJ880395	281	eyvnnpatfaadfaaamvkmseigvvtgtsgivrtlognps

**Figura A.3. Alineamiento de la secuencia de ZePrx.** Alineamiento de las secuencias proteicas codificadas por el plásmido pGreen II 0179 y por las distintas isoformas de mRNA clonadas por Gabaldón *et al.* (2005): AJ880392, AJ880393, AJ880394 y AJ880395. En fondo verde se muestran las diferencias entre las secuencias de referencia.

**Tabla A.1. Líneas parentales.** Líneas obtenidas de la transformación de *N. tabacum* con los diferentes plásmidos y resultados de los ensayos de resistencia a higromicina.

	Ratio de segregación (resistentes:sensibles)					Total
	0:1	1:0	3:1	Otros	Sin testar	
<b>Vector vacío</b>	1	2	10	2	4	19
<b>Sobreexpresión 1</b>	1	3	8	3	0	15
<b>Sobreexpresión 2</b>	0	0	9	2	0	11



**Tabla A.2. Líneas T2.** Líneas obtenidas tras la autofecundación de las líneas parentales y resultados de los ensayos de resistencia a higromicina.

	<b>Ratio de segregación (resistentes:sensibles)</b>					
	<b>0:1</b>	<b>1:0</b>	<b>3:1</b>	<b>Otros</b>	<b>Sin testar</b>	<b>Total</b>
<b>Vector vacío</b>	0	7	0	0	3	10
<b>Sobreexpresión 1</b>	0	4	0	1	3	8
<b>Sobreexpresión 2</b>	0	7	1	1	0	9