

Sobreexpresión de un gen de peroxidasa de vid como posible estrategia para la obtención de plantas tolerantes a patologías de la madera

Laura Sanjurjo Lourés

Tesis doctoral 2018

Directores: Federico Pomar Barbeito y Antonio Luis Segura Iglesias

Tutor: Federico Pomar Barbeito

Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

D. FEDERICO POMAR BARBEITO Y D. ANTONIO LUIS SEGURA IGLESIAS, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA Y PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL DE LA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, RESPECTIVAMENTE,

DECLARAN:

Que la siguiente memoria, titulada “**Sobreexpresión de un gen de peroxidasa de vid como posible estrategia para la obtención de plantas tolerantes a patologías de la madera**”, presentada por Doña **LAURA SANJURJO LOURÉS**, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña y en el Departamento de Biología Funcional de la Facultad de Biología de la Universidade de Santiago de Compostela, 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 15 de enero de 2018.

Dr. Federico Pomar Barbeito

Dr. Antonio Luis Segura Iglesias

*A mis padres, mi hermano
y mis abuelos*

Agradecimientos

Gracias a todos los que durante estos años me han ayudado y apoyado, haciendo posible este trabajo.

Gracias a mis directores de tesis, el Dr. Federico Pomar Barbeito y el Dr. Antonio Segura Iglesias, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por estar ahí hasta el final a pesar de las dificultades. Gracias por su ayuda, su apoyo y por confiar en mí.

Gracias a toda el Área de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña y de la Facultad de Biología de la Universidade de Santiago de Compostela y también a todos los miembros del Grupo de Investigación en Biología Evolutiva (GIBE) de la Universidade da Coruña, por su ayuda y por permitirme hacer uso de todos los recursos siempre que los he necesitado.

Gracias a todo el personal de los Servicios de Apoio á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña y de la Rede de Infraestruturas de Apoio á Investigación e ao Desenvolvemento Tecnolóxico (RIAIDT) de la Universidade de Santiago de Compostela, pues siempre han estado receptivos a ayudarme.

Gracias al Dr. Manuel Becerra Fernández, a la Dra. María Esther Rodríguez Belmonte y sobre todo al Dr. Agustín Rico Díaz por toda su ayuda con la purificación de la peroxidasa de vid.

Gracias al Grupo de Polímeros de la Universidade da Coruña por los ensayos del comportamiento mecánico de las plantas de tabaco. Gracias sobre todo a la Dra. Rebeca Bouza Padín por responder a mis numerosas preguntas.

Gracias a Antonio Rivera Martínez y Alfredo Taboada Arias por su gran ayuda con el “cultivo” de mis tabacos.

Gracias al Dr. José Ramón Vidal Juvíño por su ayuda en la búsqueda de centros donde realizar mis estancias de investigación y gracias también por confiar en mí.

Gracias a todo el personal del AlPlanta Institute for Plant Research de Alemania, sobre todo a los miembros del Grupo de Biotecnología de la Vid. Gracias al Dr. Goetz Reustle y al Dr. Guenther Buchholz por permitirme realizar una estancia en su laboratorio. En especial gracias al Dr. Guenther Buchholz por dedicarme su tiempo, por todo lo que he aprendido de él, por sus consejos y críticas (siempre constructivas) que tan importantes han sido para mí. Gracias también a mis compañeros por la buena acogida y por todos los momentos que pasamos juntos.

Gracias al Dr. José Miguel Martínez Zapater por permitirme hacer una estancia en su laboratorio en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), por sus consejos y aportación de ideas. Gracias al Dr. Pablo Carbonell Bejerano por sus explicaciones y al Dr. Jérôme Grimplet por su inestimable ayuda, por todos sus consejos, por contestar siempre a mis numerosas preguntas y por darme siempre ánimos. Gracias también a mis compañeros durante esa estancia por lo bien que me acogieron y por tratarme como a una más del laboratorio.

Gracias a la catedrática Dra. Gloria Revilla por su apoyo con la docencia, sus consejos y sus palabras de ánimo. A Cristina Gianzo, por toda su ayuda y consejos con la parte experimental de mi tesis. Y sobre todo al Dr. Javier Sampedro, por la paciencia que ha tenido siempre conmigo contestando a mis continuas preguntas, por todo lo que he aprendido de él, por sus consejos y su apoyo.

Gracias a mis compañeros de la Universidade de Santiago de Compostela. A Vero y Patri, por todos sus consejos con el cultivo *in vitro*, por su apoyo y sobre todo porque siempre que las necesité estuvieron ahí para darme ánimos, gracias también por nuestras “charlas científicas” durante las comidas. A Mariluz, por sus constantes palabras de apoyo y de ánimo. Y también a Rubén y a Analí, por su ayuda en el laboratorio.

Gracias a mis compañeros de la Universidade da Coruña, por su apoyo, los buenos momentos que compartí con ellos y porque junto a ellos el trabajo se hace más llevadero. A Alba, por su gran ayuda con mis “amigas” las ligninas y las peroxidasas y por su paciencia con mis innumerables preguntas, a las que ella siempre *sape* contestar. A Marta, por estar siempre ahí, por todos los trabajos de los que fuimos coautoras y porque por difícil que parezca ella siempre sabe verle algo bueno a todo. A Manu, por lo que nos enseña día a día y por sus lecciones de informática, espero que me sean útiles en esta nueva etapa. A Jorge y a Diego, porque a pesar de que hemos coincidido poco tiempo han sido muy buenos compañeros de laboratorio y aún mejores como nuevos fichajes para nuestras tertulias de los cafés. A Irene, porque siempre que necesité su ayuda pude contar con ella, a pesar de que más de una vez me hizo pensar que había un fantasma en el laboratorio. A Tania y a Ana, por lo mucho que me arroparon cuando llegué al laboratorio, que cuando una es nueva se agradece, y mucho. A Carlos y a Alexander, por transmitirme que con empeño uno puede lograr lo que se proponga. A Tere, por su ayuda con los isoelectroenfoques y por darme ánimos desde Alemania. A Cris, mi gran adversaria por quién consigue el mejor *outfit* de laboratorio (chándal vs. abrigo-bata), gracias por todo su apoyo. A Rafa, por ser un gran amigo (aunque muchas

veces nos dé plantón por las diatomeas), por nuestros muestreos en San Juan, nuestro transporte de mercancías Santiago-A Coruña y por ese libro que tenemos pendiente.

Gracias a la Dra. Cristina Silvar Pereiro por sus palabras de ánimo, sus consejos y porque siempre que le pedí ayuda estuvo ahí.

Gracias a la Dra. Esther Novo Uzal por toda su ayuda, por resolver siempre mis dudas, por los consejos y las palabras de apoyo.

Gracias al Dr. José Díaz, a la Dra. María de los Ángeles Bernal y al Dr. Javier Veloso, por darme siempre ánimos y por su apoyo.

Gracias al Dr. Mr. Pablo Trigo, que empezó siendo el que me echó la super bronca porque no germinaron las semillas y con los años se convirtió en uno de mis mejores amigos. Gracias por estar siempre ahí.

Gracias también a aquellos amigos y amigas que a pesar de no haber coincidido nunca con ellos en el laboratorio han sido de gran importancia para la finalización de este trabajo, por su gran apoyo, por escucharme siempre que lo he necesitado, por sus consejos y porque siempre saben cómo sacarme una sonrisa, Viky, Anita, Lu, José Ramón y José Alberto, gracias.

Gracias a mi familia por su apoyo y su enorme ayuda, sin la cual no hubiese sido capaz de acabar este trabajo.

Por último, gracias al Dr. Javier Tello Moro, a la Dra. Lucie Fernández y a los miembros del Tribunal de Tesis por revisar este trabajo.

Agradezco también el haber sido beneficiaria de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (Gobierno de España), así como de una ayuda complementaria dentro del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (Gobierno de España) para la realización de mi estancia en el AlPlanta Institute for Plant Research de Alemania.

Abstract

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most economically important crops worldwide. However, it is susceptible to several diseases caused by a wide range of organisms. Among them white root rot caused by *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) P. Kumm. and trunk diseases are particularly serious because there is no effective control method against.

A innovative approach is to generate a transgenic grapevine with modified content and/or composition of its lignins to increase tolerance. Therefore, the aim of this dissertation is to assess the potential of this strategy through the characterization of a grapevine peroxidase gene (*VviPrx73*) and its expression in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants to analyze their phenotypical changes.

Our results suggest an involvement of *VviPrx73* in cell wall lignification, nevertheless its expression in transgenic tobacco plants has not been found to be related to a phenotype of interest in terms of defense against pathogens. Apart from the significant increase in apoplastic peroxidase activity against coniferyl and sinapyl alcohols observed in all transgenic lines, one of the transgenic lines has shown phenotypic differences compared to controls and these differences do not correlate with the presence of *VviPrx73*.

Resumen

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial desde un punto de vista económico. Sin embargo, es susceptible a numerosas enfermedades provocadas por un amplio rango de organismos. Entre ellas la podredumbre blanca radicular provocada por *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) P. Kumm. y las enfermedades del tronco son particularmente severas debido a que no existen métodos efectivos de control frente a ellas.

Una nueva estrategia sería la de generar vides transgénicas con un diferente contenido y/o composición de sus ligninas para aumentar su tolerancia. Por ello, el objetivo de este trabajo es el de evaluar el potencial de esta estrategia mediante la caracterización de un gen de peroxidasa de vid (*VviPrx73*) y su expresión en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) transgénicas para analizar sus cambios fenotípicos.

Nuestros resultados sugieren la implicación de VviPrx73 en la lignificación de la pared celular, sin embargo su expresión en plantas de tabaco transgénicas no se ha visto que esté relacionada con un fenotipo de interés en términos de resistencia a patógenos. Aparte del aumento significativo en la actividad peroxidasa frente al alcohol coniferílico y al sinapílico observado en el apoplasto de todas las líneas transgénicas, solo se han visto diferencias fenotípicas entre una de las líneas transgénicas y el control, y estas diferencias no parecen estar relacionadas con la presencia de VviPrx73.

Resumo

A vide (*Vitis vinifera* L.) é un dos cultivos máis importantes a nivel mundial dende un punto de vista económico. Sen embargo, é susceptible a numerosas enfermidades provocadas por un amplo rango de organismos. Entre elas a podremia branca radicular provocada por *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) P. Kumm. e as enfermidades do tronco son particularmente severas debido a que non existen métodos efectivos de control fronte a elas.

Unha nova estratexia sería a de xerar vides transxénicas con un diferente contido e/ou composición das súas ligninas para aumentar a súa tolerancia. Por iso, o obxectivo deste traballo é o de avaliar o potencial desta estratexia mediante a caracterización dun xene de peroxidasa de vide (*VviPrx73*) e a súa expresión en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) transxénicas para analizar os seus cambios fenotípicos.

Os nosos resultados suxiren a implicación de VviPrx73 na lignificación da parede celular, sen embargo a súa expresión en plantas de tabaco transxénicas non se viu que estivese relacionada cun fenotipo de interese en termos de resistencia a patóxenos. Aparte do aumento significativo na actividade peroxidasa fronte ó alcohol coniferílico e ó sinapílico observado no apoplasto de tódalas liñas transxénicas, só se viron diferenzas fenotípicas entre unha das liñas transxénicas e o control, e estas diferenzas non parecen estar relacionadas coa presenza de VviPrx73.

Resumen

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most economically important crops worldwide. However, it is susceptible to several diseases caused by a wide range of organisms. More specifically several fungal diseases are responsible for significant crop losses. In temperate and humid climate regions, such as Galicia, fungal diseases are particularly aggressive. Among them white root rot caused by *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) P. Kumm. and trunk diseases are particularly serious in the region because there is no effective control method against.

In general, the protection of vineyards against pathogens is mainly based on repeated applications of agrochemicals. This practice leads to substantial costs increase and is less and less tolerated by the public because of its negative impact on the environment and poses a risk to human health. These problems, together with the difficulty of finding effective agrochemicals against *Armillaria mellea* and causal agents of trunk diseases in general, highlights the importance of designing new strategies to protect grapevine against them.

A innovative approach is to generate a transgenic grapevine with modified content and/or composition of its lignins to increase tolerance. Lignins are hydrophobic heteropolymers composed of H (*p*-hydroxyphenyl), G (guaiacyl) and S (syringyl) units, derived from the oxidative coupling of three monolignols, *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols, respectively. The reaction is mediated by both laccases and class III plant peroxidases. We propose that such a modification could generate a barrier that hinders pathogen attack and colonization of host tissues.

Therefore, the aim of this dissertation is to assess the potential of this strategy through the expression of a grapevine peroxidase gene in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) and the analysis of the phenotypical changes.

The first step comprised the design of an expression cassette to drive the constitutively high expression of transgenes in plants. To this end, the grapevine actin 7 gene promoter and terminator were isolated and their ability to induce the constitutive expression of the *uidA* reporter gene in tobacco plants was evaluated. The results showed that these grapevine regulatory sequences drive the constitutive expression of *uidA* at higher levels than the standard 35S cauliflower mosaic virus promoter and the

cauliflower mosaic virus terminator. Moreover, *uidA* expression driven by grapevine regulatory sequences was stable among transgenic lines.

Once the appropriate regulatory sequences were selected, they were used to express the grapevine gene annotated as peroxidase 73 (VviPrx73) in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana benthamiana* Domin plants. This gene was selected because it encodes a prototypical class III peroxidase involved in lignification.

VviPrx73 produced by agroinfiltrated *N. benthamiana* plants was purified and its ability to oxidize coniferyl and sinapyl alcohols was determined. The enzymatic activity assays performed proved that VviPrx73 is expressed in its functional form and it is capable of oxidizing both substrates, nevertheless for sinapyl alcohol VviPrx73 is a poor catalyst.

We expressed the fusion protein GFP-VviPrx73 to investigate the apoplastic localization of the enzyme. Imaging of GFP fluorescence of tobacco plants transformed with GFP-VviPrx73 showed accumulation of green fluorescence in the apoplast. The apoplastic localization of VviPrx73 was further confirmed by its identification, through peptide mass fingerprinting of apoplastic fractions.

Altogether, these data support the role of VviPrx73 in lignification, so the next step was the phenotypic analysis of tobacco plants expressing *VviPrx73* coding region.

These transgenic plants showed higher sinapyl- and coniferyl- peroxidase activities than controls. Even though VviPrx73 preferentially oxidizes coniferyl alcohol, coniferyl-peroxidase/sinapyl-peroxidase activities ratio was the same on both controls and transgenic lines. This is probably associated to the change of expression pattern of peroxidase isoforms in the apoplast of transgenic tobacco plants as revealed by isoelectrofocusing.

Quantitative analysis of lignins did not reveal significant differences between transformed plants and controls, only a slightly higher lignins content in transgenic plants. Wiesner and Mäule histochemical stainings also did not reveal any changes.

Qualitative analysis of lignins by means of thioacidolysis and alkaline nitrobenzene oxidation only showed significant differences between one of the three transgenic lines analyzed, whose G/S unit *ratio* was higher than the controls. Interestingly, this transgenic line exhibited significantly lower modulus E value than controls, which means less stiffness compared with wild type, as well as faster growth and faster development.

FTIR spectra of tobacco cell walls revealed a slightly higher carbohydrate content in transformed plants than controls.

All these results suggest an involvement of VviPrx73 in cell wall lignification, nevertheless its expression in transgenic tobacco plants has not been found to be related to a phenotype of interest in terms of defense against pathogens. Apart from the significant increase in apoplastic peroxidase activity against coniferyl and sinapyl alcohols observed in all transgenic lines, one of the transgenic lines has shown phenotypic differences compared to controls and these differences do not correlate with the presence of VviPrx73.

Índice

<i>I-Introducción</i>	1
I 1. La vid	3
I 1.1. Clasificación taxonómica y características generales.....	3
I 1.2. Importancia de la vid como cultivo	5
I 1.3. La vid en Galicia	6
I 1.3.1 La variedad Albariño	7
I 1.4. Problemática de la protección de la vid frente a enfermedades	8
I 1.4.1 Enfermedades que afectan a las vides gallegas.....	8
I 1.4.2 Necesidad de nuevas estrategias de defensa de las vides en la actualidad ..	13
I 2. Transformación genética dirigida a la defensa de la vid frente a patógenos.....	15
I 2.1. Utilidad de la transformación genética en la defensa de la vid	15
I 2.2. Estrategias para la obtención de líneas resistentes	16
I 2.3. Optimización de las construcciones empleadas en transformación genética	17
I 2.3.1 Intragénesis y cisgénesis	22
I 2.4. Posibles dianas para la obtención de líneas resistentes a patógenos	23
I 3. Alteración de las ligninas de la vid como posible estrategia defensiva frente a afecciones de la madera.....	28
I 3.1. Las ligninas.....	28
I 3.2. Papel de las ligninas en la defensa constitutiva e inducida de las plantas.....	29
I 3.3. Síntesis de ligninas	31
I 3.4. Las peroxidasas de clase III como posibles dianas para emprender un programa de mejora de la vid.....	33
I 3.4.1 Las peroxidasas	33
I 3.4.2 Estructura de las peroxidasas de clase III	35
I 3.4.3 Funciones de las peroxidasas de clase III	37
I 3.4.4 Peroxidasas de clase III en la vid.....	38
I 3.4.5 Peroxidasas de clase III y resistencia a patógenos.....	39
I 4. Bibliografía	41
<i>C₁-Capítulo 1</i>	59
C ₁ 1. Introducción.....	61
C ₁ 2. Objetivos.....	64
C ₁ 3. Materiales y métodos.....	65
C ₁ 3.1. Construcción del árbol de distancias de los genes de actinas de <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> y de vid	65

C ₁ 3.2. Construcción de una colección de plásmidos con el gen reportero <i>uidA</i> bajo el control de diferentes combinaciones de promotor/terminador	65
C ₁ 3.2.1 Construcción del plásmido pJit62(<i>uidA</i>)	67
C ₁ 3.2.2 Construcción de los plásmidos basados en el pGreenII0179	69
C ₁ 3.3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	70
C ₁ 3.4. Obtención de plantas de tabaco transgénicas	71
C ₁ 3.4.1 Transformación de tabaco mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	71
C ₁ 3.4.2 Selección de las plantas transformadas y obtención de líneas transgénicas homocigotas	72
C ₁ 3.5. Análisis de los niveles de expresión del gen <i>uidA</i> en plantas de tabaco transgénicas	74
C ₁ 3.5.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	74
C ₁ 3.5.2 PCR cuantitativa en tiempo real	75
C ₁ 3.5.3 Análisis de los datos obtenidos en los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real	76
C ₁ 3.6. Prueba histoquímica de la β -glucuronidasa	76
C ₁ 4. Resultados y discusión	77
C ₁ 4.1. Selección de un gen de actina de <i>Vitis vinifera</i> que se exprese de forma constitutiva y a altos niveles	77
C ₁ 4.2. Aislamiento del promotor y del terminador del gen de la actina 7 de vid	82
C ₁ 4.3. Evaluación del potencial del promotor y el terminador acotados para controlar la expresión de transgenes	83
C ₁ 5. Resumen	90
C ₁ 6. Bibliografía	91
C₂ ~Capítulo 2	97
C ₂ 1. Introducción	99
C ₂ 2. Objetivos	102
C ₂ 3. Materiales y métodos	103
C ₂ 3.1. Análisis informáticos	103
C ₂ 3.1.1 Cálculo teórico del punto isoelectrico y peso molecular	103
C ₂ 3.1.2 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de distintas peroxidases	103
C ₂ 3.1.3 Predicción de motivos en la secuencia aminoacídica de VviPrx73	103
C ₂ 3.1.4 Predicción de la localización subcelular de VviPrx73	104
C ₂ 3.2. Construcción de los plásmidos	104
C ₂ 3.2.1 Clonación de la región codificante del gen de la peroxidasa 73 de vid (<i>VviPrx73</i>)	104

C ₂ 3.2.2 Clonación de la secuencia que codifica para la proteína de fusión GFP-VviPrx73	108
C ₂ 3.3. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	112
C ₂ 3.4. Obtención de plantas de tabaco transgénicas.....	113
C ₂ 3.4.1 Transformación estable de tabaco mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	113
C ₂ 3.4.2 Selección de las plantas transformadas y obtención de líneas transgénicas homocigotas	113
C ₂ 3.5. Agroinfiltración de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	114
C ₂ 3.6. Análisis de los niveles de expresión de la secuencia que codifica para VviPrx73 mediante PCR semicuantitativa	115
C ₂ 3.6.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	115
C ₂ 3.6.2 PCR semicuantitativa	115
C ₂ 3.7. Extracción de proteínas de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y purificación de VviPrx73	117
C ₂ 3.7.1 Extracción de proteínas de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	117
C ₂ 3.7.2 Purificación de VviPrx73 mediante cromatografía de intercambio catiónico	117
C ₂ 3.8. Extracción de proteínas del apoplasto de <i>Nicotiana tabacum</i>	118
C ₂ 3.9. Determinación de la cantidad total de proteínas	118
C ₂ 3.10. Determinación de la actividad peroxidasa frente a diferentes sustratos y estudio del efecto de inhibidores sobre esta.....	119
C ₂ 3.10.1 Determinación de la actividad peroxidasa frente a diferentes sustratos	119
C ₂ 3.10.2 Estudio del efecto de los inhibidores ácido ferúlico y tropolona sobre las actividades sinapil- y coniferil- peroxidasa.....	119
C ₂ 3.10.3 Análisis estadístico de las medidas de actividad peroxidasa en <i>N. tabacum</i>	119
C ₂ 3.11. Obtención del patrón de proteínas apoplásticas mediante electroforesis disociante SDS-PAGE (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)	120
C ₂ 3.11.1 Desarrollo de la electroforesis disociante SDS-PAGE	120
C ₂ 3.11.2 Tinción de los geles con plata	120
C ₂ 3.11.3 Tinción de los geles con azul de Coomassie	121
C ₂ 3.12. Obtención del patrón de isoenzimas de peroxidasa mediante isoelectroenfoque	121
C ₂ 3.12.1 Desarrollo del isoelectroenfoque.....	121
C ₂ 3.12.2 Revelado de las isoenzimas de peroxidasa.....	122

C ₂ 3.13. Verificación de la presencia de VviPrx73 en el apoplasto de las líneas transgénicas mediante PMF (<i>peptide mass fingerprinting</i>)	122
C ₂ 3.14. Estudio de la localización subcelular de la proteína de fusión GFP-VviPrx73	123
C ₂ 3.14.1 Preparación de las plántulas que producen la proteína de fusión para su visualización al microscopio confocal	123
C ₂ 3.14.2 Tratamiento con manitol para provocar la plasmólisis de las células de las plántulas de tabaco	124
C ₂ 3.14.3 Visualización de la localización subcelular de la proteína de fusión al microscopio confocal	124
C ₂ 4. Resultados y discusión	125
C ₂ 4.1. Validación de la anotación de VIT_07s0129g00360 como gen que codifica para una peroxidasa de clase III.....	125
C ₂ 4.2. Clonación, expresión heteróloga y purificación de VviPrx73 para la realización de ensayos de actividad enzimática.....	127
C ₂ 4.2.1 Clonación de la secuencia que codifica para VviPrx73	127
C ₂ 4.2.2 Expresión heteróloga y purificación de VviPrx73	128
C ₂ 4.2.3 Ensayos de actividad enzimática frente a sustratos de la lignificación... ..	129
C ₂ 4.3. Localización subcelular de VviPrx73	132
C ₂ 4.4. Obtención de líneas de tabaco transgénicas que producen VviPrx73.....	134
C ₂ 4.4.1 Obtención de líneas de tabaco que expresan la secuencia que codifica para VviPrx73	134
C ₂ 4.4.2 Verificación de la presencia de VviPrx73 en las líneas transgénicas seleccionadas	136
C ₂ 4.5. Actividad peroxidasa en el apoplasto de las líneas transgénicas	139
C ₂ 5. Resumen	143
C ₂ 6. Bibliografía.....	145
C₃~Capítulo 3	153
C ₃ 1. Introducción.....	155
C ₃ 2. Objetivos.....	159
C ₃ 3. Materiales y métodos.....	160
C ₃ 3.1. Localización histoquímica de ligninas.....	160
C ₃ 3.1.1 Tinción de Wiesner	160
C ₃ 3.1.2 Tinción de Mäule	160
C ₃ 3.2. Obtención de las paredes celulares	161
C ₃ 3.3. Análisis de las paredes celulares.....	161
C ₃ 3.3.1 Cuantificación de ligninas con bromuro de acetilo.....	161

C ₃ 3.3.2	Análisis mediante espectroscopía FTIR (<i>Fourier transform infrared</i>)...	162
C ₃ 3.3.3	Oxidación de las paredes celulares con nitrobenzeno	162
C ₃ 3.3.4	Análisis cualitativo mediante tioacidolisis	163
C ₃ 3.4.	Ensayos del comportamiento mecánico	164
C ₃ 3.5.	Biometrías	165
C ₃ 4.	Resultados y discusión	166
C ₃ 4.1.	Efecto de la presencia de la peroxidasa 73 (VviPrx73) sobre el contenido en ligninas de las plantas de tabaco transgénicas	166
C ₃ 4.2.	Alteraciones a nivel histológico asociadas a la presencia de VviPrx73	167
C ₃ 4.3.	Análisis de la composición de las ligninas mediante oxidación con nitrobenzeno y tioacidolisis	169
C ₃ 4.4.	Análisis de la composición de las paredes mediante espectroscopía FTIR..	175
C ₃ 4.5.	Caracterización de los transformantes a través del análisis de las propiedades mecánicas de sus tallos	182
C ₃ 4.6.	Caracterización de los transformantes a través del análisis de posibles modificaciones de su crecimiento/desarrollo	185
C ₃ 5.	Resumen	188
C ₃ 6.	Bibliografía	191
	C-Conclusiones	199
	A-Anexos.....	203
A 1.	Transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	205
A 1.1.	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> cepa DH5α	205
A 1.2.	Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico	205
A 1.3.	Selección de las bacterias que incorporaron el plásmido de interés	206
A 2.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	207
A 3.	Obtención de líneas de tabaco transgénicas homocigotas	208
A 4.	Extracción de ARN de vid.....	209
A 5.	Bibliografía	211

I~Introducción

I 1. La vid

I 1.1. Clasificación taxonómica y características generales

La botánica sistemática sitúa al género *Vitis* dentro de la familia *Vitaceae*, perteneciente a la subclase *Rosidae* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

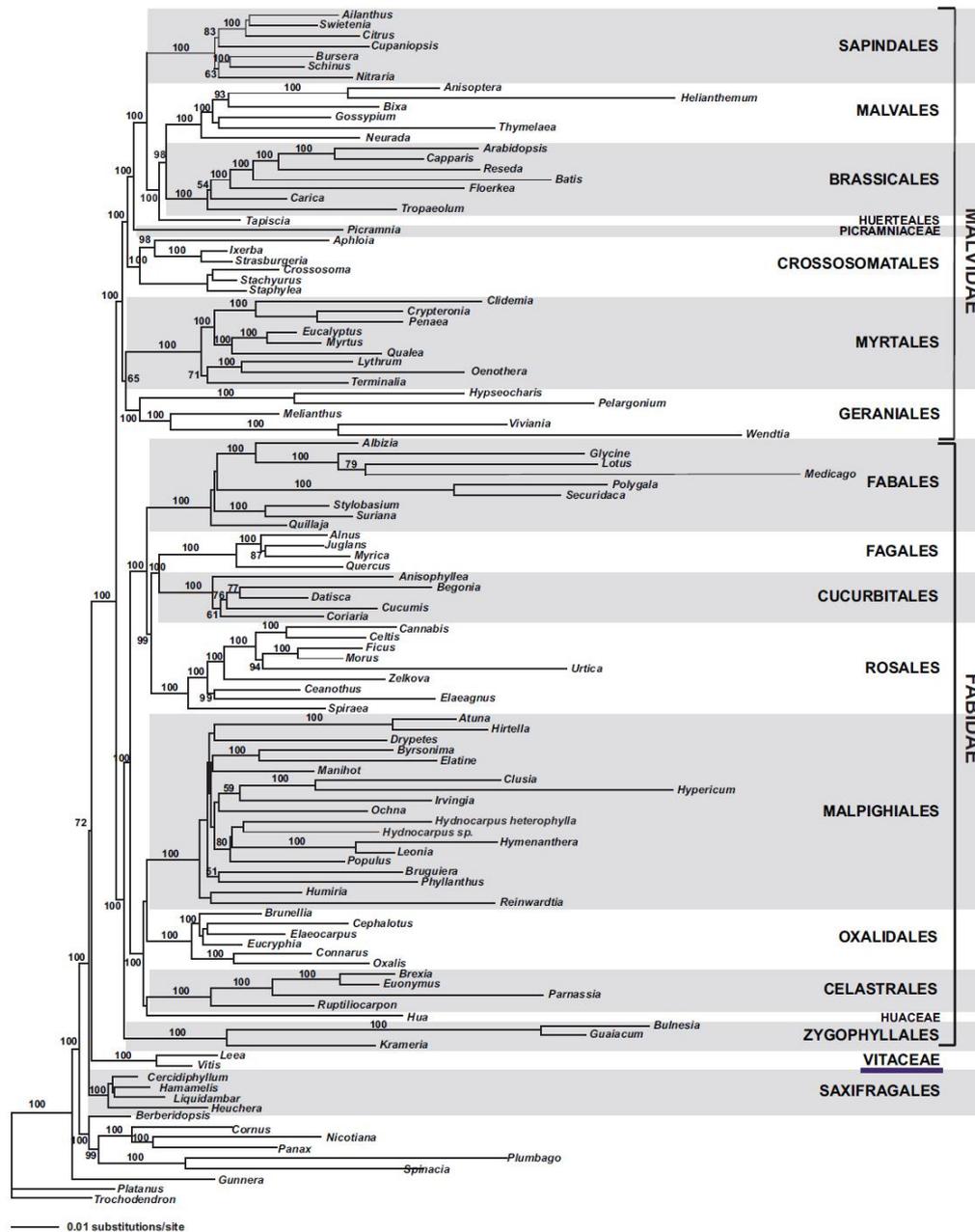


Figura I 1.- Árbol de *maximum likelihood* resultado del análisis mediante GARLI (*genetic algorithm for rapid likelihood inference*) de los datos de 2 genes nucleares y 10 genes plastidiales para 117 miembros de la subclase *Rosidae* y *outgroups* y de repeticiones inversas plastidiales para 59 taxones. Los números situados sobre las ramas son los valores de *bootstrap*. Imagen tomada de Wang *et al.* (2009).

I-Introducción

Si bien la posición que ocupa dentro de esta subclase siempre ha sido objeto de gran controversia, estudios recientes sitúan a la familia *Vitaceae* como un grupo hermano de los dos grandes clados que engloban a la mayoría de las *Rosidae*: las eurosidas I (*Fabidae*) y las eurosidas II (*Malvidae*) (**Wang et al., 2009**) (**Figura I 1**).

El género *Vitis* se divide en dos subgéneros: *Muscadinia* Planch. ($2n=40$) y *Vitis* Planch. ($2n=38$). A su vez, este último subgénero se divide en 2 clados, el Norteamericano y el Euroasiático (**Miller et al., 2013**).

Dentro de las vides Euroasiáticas se engloba la especie *Vitis vinifera* L., que a su vez se divide en dos subespecies: *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (vid silvestre) y *Vitis vinifera* ssp. *sativa* (vid cultivada). Según algunos autores, esta última provendría de la domesticación de la subespecie *sylvestris* (**Arroyo-García et al., 2006**). De aquí en adelante nos referiremos a *Vitis vinifera* ssp. *sativa* únicamente como *Vitis vinifera* o como vid.



Figura I 2.- Imagen del libro Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte correspondiente a *Vitis vinifera* L.

La vid es una planta leñosa y trepadora, que puede alcanzar hasta 35 metros de longitud. El tronco es retorcido y tortuoso, con la corteza gruesa y áspera, que se desprende en

tiras en la madurez. Las ramas jóvenes (sarmientos) son flexuosas y están engrosadas en los nudos. Las hojas son pecioladas, de 5-15 cm, orbiculares, cordadas, generalmente palmeadas, con 5-7 lóbulos e irregularmente dentadas, con el haz glabrescente y el envés a menudo tomentoso. Los zarcillos son ramificados y opositifolios. Las flores son pequeñas, actinomorfas, hermafroditas, pentámeras, dispuestas en panículas colgantes y opuestas a las hojas (**Santos *et al.*, 2005**) (**Figura I 2**).

El cáliz tiene 5 sépalos poco desarrollados. La corola es de color verdoso, con 5 pétalos de unos 5 mm soldados en la punta. El androceo está formado por 5 estambres, que alternan con los sépalos y se insertan bajo el margen del disco nectarífero pentalobulado. El ovario es súpero, bilocular y está rodeado en la base por el disco glandular; el estilo es muy corto y el estigma discoidal. El fruto es una baya, de 6-22 mm, globosa o elipsoidal, negra, rojiza, amarillenta o verdosa, con 2-4 semillas (**Santos *et al.*, 2005**).

I 1.2. Importancia de la vid como cultivo

La vid es, a nivel mundial, el cultivo frutal más ampliamente extendido y el más importante desde un punto de vista económico (**Vivier y Pretorius, 2002**). Su importancia radica en los múltiples usos que se hacen de su fruto, siendo empleado para la elaboración de vino, fabricación de mosto o para el consumo directo (uva de mesa) (**Terral *et al.*, 2010**). Además, de la vid se pueden obtener productos de interés como el resveratrol, al que se atribuyen propiedades medicinales (**Aggarwal *et al.*, 2004**).

Según los datos del EUROSTAT (<http://ec.europa.eu/eurostat>), España es el tercer mayor productor de uva de la Unión Europea, por detrás de Italia y Francia. Sin embargo, es el país de la Unión Europea que más superficie dedica a viñedo.

La superficie total de viñedo en España es de 968.769 ha, de las cuales 955.717 ha se dedican a uva de transformación y 13.052 ha se dedican a uva de mesa (datos tomados de la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE) 2016, del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España). Las estimaciones de producciones vitivinícolas de la cosecha 2016 en España sitúan la producción de vino y mosto en 43,6629 millones de hl (dato tomado de los Avances de Superficies y Producciones de Cultivos de enero 2017, del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España). Estos datos dan cuenta de la gran importancia que tiene el cultivo de la vid en nuestro país.

I 1.3. La vid en Galicia

En Galicia, el cultivo de la vid ha estado siempre asociado a la producción de vino. Aunque ya existían cepas en Galicia, fueron los romanos los que establecieron las primeras plantaciones ordenadas, pudiendo considerárseles los padres de nuestra viticultura. A partir del siglo X el cultivo del viñedo se consolidó, impulsado sobre todo desde los monasterios **(Carballido, 2017)**.

La viticultura gallega tuvo su primera gran crisis hacia finales del siglo XIX, debido a la aparición del oídio y de la filoxera. Esto, en conjunción con la fuerte emigración que sufrió Galicia en esa época, fue devastador para el sector vitivinícola **(Carballido, 2017)**.

La reconstrucción de la viticultura gallega, tras la devastación ocasionada por el oídio y la filoxera, se basó en el empleo de híbridos productores directos (cruces entre la vid Euroasiática y las especies Norteamericanas) y de cepas Euroasiáticas injertadas sobre vides Norteamericanas. Sin embargo, estas estrategias, basadas más en una alta producción que en la calidad del producto, no constituyeron una buena elección, dificultando la recuperación de nuestra viticultura. Por una parte, los fermentados obtenidos a partir de los híbridos productores directos poseen una calidad muy inferior a la de los vinos producidos por la vid Euroasiática, y por otra, las cepas Euroasiáticas seleccionadas para ser injertadas sobre vides Norteamericanas fueron las variedades de origen mediterráneo Palomino Fino-Jerez en blancas y Garnacha Tintorera-Alacant Bouschet en tintas, no adaptadas a nuestras particularidades ecoclimáticas, y por tanto, también incapaces de proporcionar altas calidades. Todo ello en un momento en que los mercados empezaban a demandar calidad en lugar de cantidad **(Hernández Mañas, 2017)**.

A principios de la década de los 80, se reconoce la incapacidad de esta viticultura para atender las exigencias de calidad y personalidad de los vinos demandados por los consumidores, y se inicia un proceso de cambio de la viticultura gallega hacia el empleo, de nuevo, de las variedades autóctonas. Un hecho importante fue la creación, en 1986, del Plan de Calidade dos Viños de Galicia por parte de la Consellería de Agricultura, Gandeiría e Montes. Este Plan establecía la conveniencia de un incremento paulatino, pero firme, de las variedades ancestrales en nuestros viñedos, ya que solo estas variedades serían capaces de producir vinos de alta calidad y tipicidad. Con este Plan se intentó reconducir la viticultura gallega desde el enfoque productivista hacia otro basado en la calidad diferenciada del producto. En el marco de este Plan nacieron

instituciones como la Estación de Viticultura y Enología de Galicia, que inició sus actividades en el año 1987 y cuyo eje fundamental era el plan de selección clonal y sanitaria de la vid en Galicia, que pretendía disponer de material vegetal autóctono de calidad y sanidad contrastadas (**Hernández Mañas, 2017**).

Actualmente, la vitivinicultura gallega apuesta por la calidad y recuperación de las variedades tradicionales de cada zona, que aportan a los vinos una personalidad propia y distintiva de cada región. De este modo, se pone en valor, además de la calidad de los vinos, su singularidad, personalidad e identidad diferencial (**Carballido, 2017**). A día de hoy, Galicia cuenta con una gran diversidad de variedades de vid, tanto es así que alberga el 60 % de los tipos de uva que existen en España, sin embargo, no todas las variedades cultivadas en Galicia son variedades autóctonas. Algunas de las variedades autóctonas son Albariño, Godello, Lado, Loureira, Blanca de Monterrei, Dona Blanca, Torrontés y Treixadura, entre las blancas; Brancellao, Caño Tinto, Espadeiro y Sousón, entre las tintas (**Martínez Chantada et al., 1999; Fisac Muños, 2015**).

Prueba de la importancia del sector vitivinícola en Galicia son las 25.950 ha dedicadas a viñedo, cuya totalidad es dedicada a uva de transformación (datos tomados de la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE) 2016, del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España). También las 5 Denominaciones de Origen (D.O.) con que cuenta: Monterrei, Valdeorras, Ribeiro, Rías Baixas y Ribeira Sacra. Además de sus 3 Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.): Viño da Terra de Betanzos, Viño da Terra do Barbanza e Iria y Viño da Terra do Val do Miño-Ourense. Otra de las pruebas es la buena acogida que tienen nuestros vinos entre los expertos. Enólogos especializados resaltan la potencialidad de Galicia para producción de grandes vinos, por las características únicas de esta región en cuanto a clima, terrenos y variedades autóctonas (**Fisac Muños, 2015**).

I 1.3.1 La variedad Albariño

En la actualidad, la variedad Albariño es sin lugar a duda la de mayor importancia dentro del sector vitivinícola gallego, y el vino elaborado con ella uno de los productos agroalimentarios de mayor valor económico para Galicia (**Martínez-Rodríguez et al., 2009**). Es variedad preferente en las Denominaciones de Origen Rías Baixas y Ribeira Sacra, y variedad complementaria en la Denominación de Origen Ribeiro (**Martínez Rodríguez et al., 2006**).

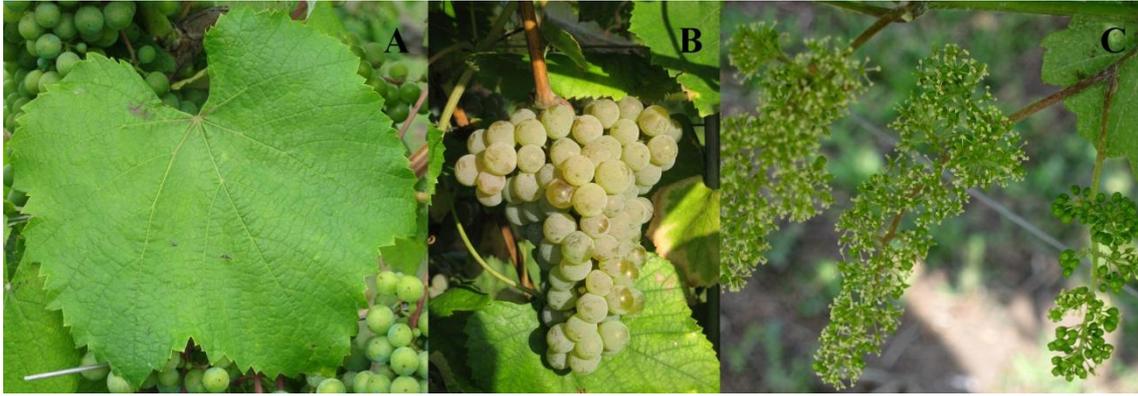


Figura I 3.- Variedad Albariño. A: hoja. B: racimo. C: inflorescencias. Imágenes tomadas de la web de la Misión Biológica de Galicia, CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

El Albariño (**Figura I 3**) es una variedad de racimo pequeño, a veces con un ala tan grande que el racimo parece doble. La compacidad es media-compacta y el pedúnculo corto. Sus bayas son pequeñas, de forma esférica, piel color verde-amarilla y pulpa incolora (**Figura I 3B**). La hoja adulta es pentagonal entera o ligeramente trilobulada, con senos poco marcados. El seno peciolar es abierto, en V (**Figura I 3A**), y el envés tiene una pilosidad fuerte. La calidad enológica global de esta variedad se clasifica como excelente, dando lugar a vinos con graduación alcohólica elevada y notable acidez. Poseen un gran potencial aromático afrutado con matices a veces florales (datos obtenidos de la web del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente del Gobierno de España y de la web de la Consellería do Medio Rural de la Xunta de Galicia).

I 1.4. Problemática de la protección de la vid frente a enfermedades

I 1.4.1 Enfermedades que afectan a las vides gallegas

Las vides gallegas son objeto del ataque de numerosos patógenos, pertenecientes a grupos muy diversos y que atacan a estas plantas en sus diferentes estados fenológicos. Entre las enfermedades y plagas más frecuentes están la cochinilla algodonosa, el pedroulo, los noctuidos, la excoriosis, las acariosis, el oídio, los trips, la araña roja, el mildiu, los cicadélidos, la polilla del racimo, el complejo yesca, el cicadélido de la flavescencia dorada y la podredumbre gris (**García Novais, 1999**).

A esto hay que sumar que la climatología gallega, con unas temperaturas suaves, lluvias dispersas, alta humedad y frecuente niebla, es muy favorable para el desarrollo de enfermedades fúngicas y también del mildiu, haciéndolas especialmente agresivas y

ocasionando enormes pérdidas (**García Novais, 1999**).

Existen numerosos estudios sobre la podredumbre gris, el oídio y el mildiu, así como sobre sus agentes causales y la relación que se establece entre ellos y la vid, sin embargo, la información disponible acerca de las afecciones de la madera en la vid es mucho más escasa, sobre todo en cuanto a lo que a mecanismos de defensa se refiere. Este tipo de patologías están provocadas, principalmente, por el conjunto de hongos denominados hongos de la madera y por *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) P. Kumm., que también ataca a los tejidos leñosos.

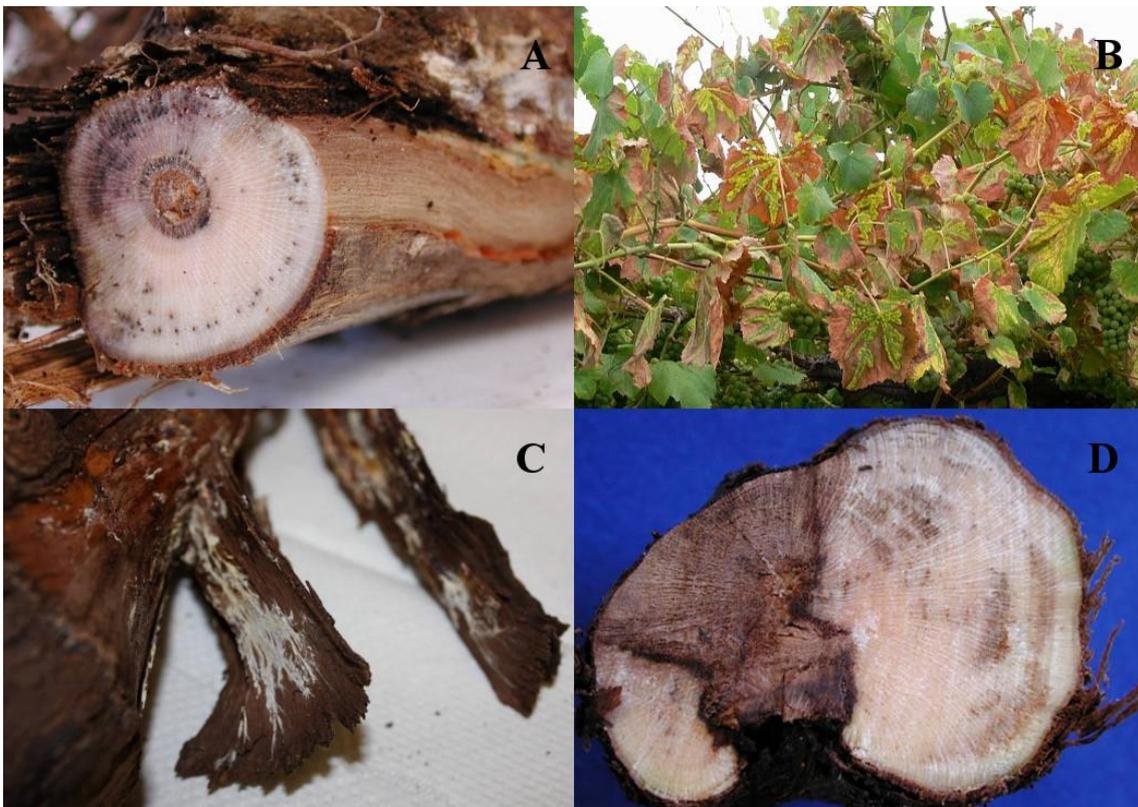


Figura I 4.- Enfermedades de la vid. A: sección de tallo afectado por enfermedades de la madera, se puede observar el oscurecimiento de los anillos y obturación de algunos vasos por la exudación de una sustancia gomosa de color negro. B: síntomas foliares de las patologías de la madera. C: micelio blanquecino de *A. mellea* bajo la corteza de una planta de vid infectada. D: alteración de la madera debida a yesca y eutipiosis. Las imágenes A, B y D fueron tomadas de la web de la Estación Fitopatológica do Areeiro. La imagen C fue tomada de la web de la Wine Industry Network (WIN).

Armillaria mellea (Vahl:Fr.) P. Kumm. es el agente causal de la podredumbre blanca de la raíz. Se trata de un basidiomicete saproparasítico que infecta el sistema radicular y cuello de la planta. Este hongo forma masas miceliarias blancas entre la corteza y la madera (**Figura I 4C**), que presentan contornos a menudo en forma de venas o de

I-Introducción

abanicos. Además de los abanicos miceliarios, otro signo muy característico de la enfermedad es la formación de rizomorfos, una especie de hifas especializadas en forma de cordones, con un diámetro de 1-3 mm, y que constan de una capa externa compacta negra y un núcleo central de micelio blanco o incoloro. Con frecuencia estas hifas forman una red ramificada sobre las raíces, debajo de la corteza o en la madera descompuesta, pero también pueden extenderse a través del suelo. De hecho, el principal método de propagación del hongo de una planta a otra es mediante rizomorfos, que crecen desde las raíces de los árboles infectados o desde las raíces de tocones descompuestos, a través del suelo, hasta las raíces de los árboles sanos adyacentes. Otro método de propagación de *Armillaria* es por contacto directo de las raíces de plantas sanas con raíces infectadas, en este caso el micelio invade directamente a las raíces sanas que están cerca de las raíces enfermas, sin que forme rizomorfos (**Agrios, 1995**). Para poder penetrar y colonizar los tejidos de las plantas huésped, este hongo utiliza una combinación de aplicación de fuerza mecánica y liberación de enzimas degradadoras de biopolímeros (**Baumgartner et al., 2011**).

En la vid, la infección por *Armillaria* causa la reducción en el vigor de la planta, baja calidad del fruto y en los últimos estadios de la enfermedad la muerte de la planta (**Pearson y Goheen, 1988; Aguin-Casal et al., 2004**).

Su control entraña una gran dificultad debido a su gran capacidad destructiva e infecciosa, así como a ciertas particularidades de este hongo, como son la presencia de rizomorfos que se extienden a través del suelo, a veces a profundidades considerables, y que el micelio se encuentre protegido debajo de la corteza de los tejidos vegetales colonizados (**Aguin et al., 2002**). Además, *A. mellea* es capaz de sobrevivir en el suelo por periodos largos, en restos de raíces y madera, en ausencia de un huésped vivo (**Pertot et al., 2008**).

Otro factor que convierte a este hongo en un grave peligro para las vides es el hecho de que no se dispone de métodos químicos ni biológicos eficaces para su control (**Aguin et al., 2002**). Incluso hay experimentos que indican que ciertos fungicidas, como por ejemplo los fungicidas fenólicos, no solo no son eficaces frente a *Armillaria*, sino que incluso pueden llevar a un aumento en la colonización de las raíces por el patógeno. Esto es debido a que el micelio de *Armillaria* sobrevive a la aplicación inicial del fungicida protegido en la madera y luego su crecimiento se ve estimulado. Adicionalmente, muchos microorganismos del suelo antagonistas de *Armillaria* pueden ser destruidos por los fungicidas fenólicos, dando una ventaja a *Armillaria* (**West y Fox,**

2002).

La protección de las vides frente a este hongo se centra principalmente en llevar a cabo medidas preventivas, como evitar el encharcamiento del terreno, realizar un aporte moderado de materia orgánica y eliminar todos aquellos restos vegetales que puedan servir de reservorio para el hongo (Aguín *et al.*, 2002), si bien estas estrategias no garantizan totalmente la no infección de las vides por parte de *A. mellea*. Solo ciertas prácticas como rotaciones largas (rotación de 5-10 años), que permiten un tiempo suficiente para la degradación completa de todos los restos de raíces infectadas, pueden llevar a una reducción significativa en el inóculo de *Armillaria*, reduciendo el riesgo de infección de nuevas viñas (Galet, 1977). Sin embargo, dado que en Europa la viticultura está restringida a ciertas áreas adecuadas, es prácticamente imposible reubicar un viñedo en una nueva área, y demasiado costoso tener 5-10 años de rotación, haciendo de esta medida algo inviable en la práctica.

Otro de los factores que señalan la necesidad de encontrar nuevas estrategias de control frente a este hongo es el hecho de que, a día de hoy, no se han encontrado portainjertos totalmente resistentes a *A. mellea*, si bien no todos responden del mismo modo a este patógeno, mostrando diferentes grados de susceptibilidad (Baumgartner y Rizzo, 2006; Prodorutti *et al.*, 2009).

Otro gran problema para la viticultura gallega lo plantean las denominadas enfermedades de la madera, también conocidas como enfermedades del tronco. Se trata de un conjunto de patologías fúngicas que afectan a las partes leñosas de la planta (raíces, tronco y ramas), produciendo en la vid un decaimiento general, con la consiguiente pérdida de producción de uva y una notable disminución de la calidad del fruto, y que a medio-largo plazo suelen producir la muerte de ramas y brazos o incluso la muerte de la planta. La sintomatología que presentan las plantas afectadas es variada, dado que, como ya se comentó, bajo la denominación de enfermedades de la madera se engloban las patologías provocadas por un buen número de patógenos fúngicos diferentes. Aun así, podemos citar algunos síntomas característicos, como son la presencia de lesiones necróticas y pudriciones en la madera de tronco y ramas (Figura I 4D), la obturación del xilema (Figura I 4A), síntomas foliares (como clorosis, necrosis, deformaciones y atrofia) (Figura I 4B) y lesiones y necrosis en el aparato radicular que pueden extenderse hasta la zona del portainjerto (Bertsch *et al.*, 2013; Andolfi *et al.*, 2011; Armengol *et al.*, 2001).

Bajo la denominación enfermedades de la madera se agrupan la enfermedad de Petri

I-Introducción

(los agentes causales son *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. y Mugnai y *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. y Mugnai) Crous y W. Gams), la yesca (los principales hongos asociados son, como en el caso de la enfermedad de Petri, *P. aleophilum* y *P. chlamydospora*, aunque en fases avanzadas de la enfermedad se pueden aislar de plantas afectadas los hongos descomponedores de la madera *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. y *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch., que causan graves pudriciones), eutipiosis (producida por el ascomiceto *Eutypa lata* (Pers.) Tul. y C. Tul.), pie negro (se asocia a distintas especies del género *Cylindrocarpon*, en España principalmente a *Cylindrocarpon macrodidymum* Schroers, Halleen y Crous y *Cylindrocarpon liriodendri* J.D. MacDon. y E.E. Butler), excoriosis (producida por *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc.) y enfermedades asociadas a miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* (los principales hongos responsables son *Diplodia seriata* De Not., *Diplodia mutila* (Fr.) Mont. y *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl.) (Cobos Román, 2008; Úrbez-Torres *et al.*, 2013; Agustí-Brisach y Armengol, 2013; Fourie y Halleen, 2004; Bertsch *et al.*, 2013).

Existen varios factores que las convierten en un grave problema para la viticultura a nivel mundial, y sobre todo para la viticultura de aquellas zonas con una climatología muy favorable para el desarrollo de estos hongos, como es el caso de Galicia.

El primero de ellos es la ausencia de métodos de control efectivos. Actualmente no existe en el mercado ningún producto efectivo para combatir estas patologías. Tradicionalmente eran tratadas con arsenito sódico (Fussler *et al.*, 2008; Larignon *et al.*, 2008), pero en los últimos años ha sido prohibido dada su alta toxicidad para el ser humano e impacto negativo sobre el medio ambiente (Bisson *et al.*, 2006; Spinosi y Févotte, 2009).

Un segundo factor es que, en la mayoría de las ocasiones, las plantas huésped no muestran síntomas visibles hasta haber transcurrido un largo periodo de tiempo desde el momento de la infección, que generalmente se produce a través de heridas, mayoritariamente las generadas durante la poda. Así, cuando se observan los primeros síntomas, el hongo ya está bien establecido dentro de la planta huésped (Mugnai *et al.*, 1999; Van Niekerk *et al.*, 2006; Lardner *et al.*, 2006).

Otro de los problemas radica en que no existen vides, ni dentro del grupo de las cultivadas ni dentro del grupo de las silvestres, que sean resistentes a estos patógenos (Surico *et al.*, 2006; Wagschal *et al.*, 2008; Larignon *et al.*, 2009).

De este modo, su control se centra principalmente en medidas preventivas, en su

mayoría enfocadas al momento de la poda y prevención de heridas (**Herche, 2009**).

I 1.4.2 Necesidad de nuevas estrategias de defensa de las vides en la actualidad

Desde los comienzos de la agricultura, hace aproximadamente 10.000 años, los agricultores han tenido que hacer frente a pestes, patógenos y malas hierbas para minimizar las pérdidas en sus cosechas. Estos organismos pueden ser controlados mediante métodos físicos (como por ejemplo la eliminación mecánica), biológicos (rotación de cultivos, predadores, etc.) o por la aplicación de químicos fitosanitarios (**Oerke, 2006**).

Tradicionalmente, el empleo de químicos fitosanitarios ha sido la estrategia más empleada para la defensa de los cultivos frente a enfermedades y plagas. Desde que en 1882 Millardet descubrió el gran potencial de una mezcla de sulfato de cobre y cal hidratada para el control del mildiu de la vid, a la que se denominó caldo bordelés (**Agrios, 1995**), se han desarrollado una amplia variedad de nuevos productos, cada vez más efectivos y específicos. Sin embargo, teniendo en cuenta la situación actual y las tendencias futuras, no parece que la defensa de la vid deba basarse en el empleo de estos productos. Uno de nuestros argumentos es que, a pesar de tratarse de compuestos en general muy efectivos y de que su empleo de acuerdo a las legislaciones e indicaciones de la casa comercial no supone un peligro para la salud del consumidor (**Česnik et al., 2008; Cabras y Angioni, 2000; Cabras et al., 2000**), se ha detectado la presencia de estas sustancias en ciertos vinos a niveles que superaban los límites permitidos, muy probablemente por no respetar las prácticas correctas (**Calhelha et al., 2006**), lo que sí puede ser perjudicial para la salud de los consumidores. Además, el uso de los productos fitosanitarios en grandes cantidades y/o omitiendo las prácticas correctas para su empleo, puede alterar el proceso de fabricación de los vinos y así sus características organolépticas (**Cabras et al., 1999**), y lo que es peor, puede derivar en problemas de contaminación ambiental, con el consiguiente riesgo para la salud del hombre (**Parrón et al., 2014**) y el ecosistema en general (**Elias y Bernot, 2014; Relyea, 2009**). Este uso excesivo e incorrecto de los químicos fitosanitarios, posiblemente sea en parte consecuencia del gran desafío que supone la protección de los viñedos contra enfermedades y pestes, debido a los múltiples organismos que pueden atacar a esta especie a lo largo de las diferentes fases de su ciclo.

Otro de los argumentos para apoyar la búsqueda de nuevas alternativas de protección de las vides, es la existencia de patógenos frente a los que no se dispone de fitosanitarios

I-Introducción

eficaces, este es el caso, como ya se comentó, de los complejos de hongos que provocan las denominadas enfermedades de la madera de la vid. Además se plantean ciertos retos para el futuro. Uno de ellos es el endurecimiento de las legislaciones en lo que al uso de productos fitosanitarios se refiere (**Jess et al., 2014; Lamichhane et al., 2016**). También, desde la Xunta de Galicia se promueve la protección de los viñedos mediante el empleo de la Gestión Integrada de Plagas, a la que definen como “una estrategia de control fitosanitario que consiste en la aplicación racional de una combinación de medidas biológicas, biotecnológicas, culturales, de mejora vegetal y químicas, de modo que el empleo de fitosanitarios se limite al mínimo necesario” (<http://mediorural.xunta.gal/es/institucional/publicaciones/presentacion/>).

Otro de los retos que se plantean es la aparición de resistencias (**Chapeland et al., 1999; Hahn, 2014**). En este punto, *Botrytis cinerea* Pers. constituye un caso especialmente difícil, dado su rápido desarrollo de resistencias.

También cabe mencionar todos los cambios que se están experimentando y se experimentarán en el futuro fruto del cambio climático. La vid es una especie especialmente sensible a las alteraciones en los parámetros meteorológicos, existiendo una fuerte relación entre su fenología y las temperaturas (**Duchêne, 2016**). En Galicia ya se ha constatado la variación de las fenofases de la vid resultado del cambio climático, observándose un adelanto de estas desde los años 70 y adelantándose también la época de la vendimia (**García y Díaz-Fierros, 2009**). Estas variaciones en el clima no solo afectan a las plantas huésped, sino también a los patógenos y a otros organismos que pueden influir en la relación entre huésped y patógeno, haciendo que estas interacciones puedan variar (**Elad y Pertot, 2014; Chakraborty et al., 2000**). Un ejemplo es la ampliación del área de distribución de ciertos vectores hacia zonas más al norte, debido al aumento de las temperaturas (**Boudon-Padieu y Maixner, 2007**).

En este contexto, surge la necesidad de incrementar el conocimiento en cuanto a los genes y rutas implicados en las reacciones de defensa de las plantas, para poder desarrollar nuevas estrategias para la protección de las vides. Entre estas estrategias podrían encontrarse el empleo de agentes biológicos de control (**Tronsmo y Ystaas, 1980; Sharma et al., 2009; Elad et al., 1993; Elad, 1996; Köhl et al., 1998**) y la obtención de nuevos cultivares resistentes, mediante programas de mejora tradicional o transformación genética (**Broekaert et al., 1999; Ceasar y Ignacimuthu, 2012; Wally y Punja, 2010b**).

I 2. Transformación genética dirigida a la defensa de la vid frente a patógenos

I 2.1. Utilidad de la transformación genética en la defensa de la vid

La transformación genética es una herramienta de suma utilidad para la defensa de los cultivos frente a patógenos, dado que permite tanto la caracterización de nuevos genes y rutas implicados en los mecanismos de resistencia de las plantas, como la obtención de líneas transgénicas resistentes.

A día de hoy, la disponibilidad de secuencias completas del genoma de la vid (**Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007; Di Genova et al., 2014**), la anotación de los genes (**Grimplet et al., 2012**) y los múltiples datos de transcriptómica, proteómica y metabolómica (**Díaz-Riquelme et al., 2016; Agudelo-Romero et al., 2015; Milli et al., 2012**) posibilitan la identificación de nuevos genes de potencial interés en el control de enfermedades, y aportan información acerca de las interrelaciones entre los distintos genes. Para la verificación de estos datos y conocimiento más profundo de la función de los genes y su implicación en las distintas rutas, la transformación genética constituye una herramienta de suma utilidad, al permitir la obtención de plantas genéticamente modificadas en las que se puede anular o incrementar la expresión de uno o más genes, o incluso introducir secuencias de otras especies. En este sentido, es muy recurrente, como primera aproximación, la generación de líneas transgénicas de especies herbáceas modelo, como pueden ser *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. o *Nicotiana tabacum* L. (tabaco). Esto es debido a que, a pesar del enorme avance llevado a cabo durante las últimas décadas en la biotecnología de la vid, continúa siendo dificultoso y lento generar plantas completas de vid que expresen de forma estable el gen introducido (**Vidal et al., 2010**). En contraposición, la generación de plantas transgénicas en el caso de las especies herbáceas modelo es sencilla y rápida (**Sparkes et al., 2006; Bent, 2006**), a lo que contribuyen su fácil manejo y ciclo vegetativo corto.

Otra de las posibilidades que proporciona la transformación genética es la generación de líneas transgénicas de vid con características mejoradas. Este cometido también se puede llevar a cabo mediante mejora tradicional, sin embargo, la transformación genética ofrece una serie de ventajas que cobran especial interés en el caso de la vid. Entre ellas, la más importante es que la transformación genética permite la introducción

I-Introducción

de uno o más genes en la planta receptora preservando en esta y en su descendencia el resto de su genoma original (Mirkov, 2003). De este modo, es posible obtener vides resistentes a patógenos sin variar las características organolépticas del fruto de la variedad original. Esto cobra especial importancia en el caso de las variedades destinadas a la obtención de vino, dado que el genotipo varietal y clonal de las vides con que se produce un vino es uno de los factores determinantes de las características distintivas de este (Styger *et al.*, 2011). Respecto a esto, cabe recordar todo lo mencionado en el apartado I 1.3. de esta Introducción, en el que se incidía en la importancia que tiene en nuestra viticultura el empleo de variedades autóctonas, por la alta calidad de sus vinos y características diferenciales de cada una de ellas.

La transformación genética presenta otras dos importantes ventajas frente a la mejora tradicional, ya que se trata de un proceso mucho más rápido y que permite la introducción de genes de cualquier procedencia, no siendo necesario que se encuentren en plantas que puedan ser hibridadas entre sí (Mirkov, 2003).

La obtención de líneas transgénicas que posean unas características de interés, distintas a las del tipo silvestre, y que se mantengan de forma estable, es un proceso que requiere un buen diseño experimental. En ello van a ser cruciales tres aspectos: cuál va a ser el gen (o genes) diana, qué tipo de modificación en su expresión se busca y por último cómo conseguir, de forma estable, ese patrón e intensidad de expresión deseados. Estas consideraciones se deben analizar cuidadosamente antes de llevar a cabo la transformación genética, ya que tomar la decisión correcta en cada una de ellas es crítico para el éxito en la obtención de líneas transgénicas que manifiesten las características deseadas.

I 2.2. Estrategias para la obtención de líneas resistentes

Para la obtención de líneas resistentes, mediante el empleo de la transformación genética, pueden seguirse tres estrategias. Una consiste en el silenciamiento de uno o más genes de la planta, la segunda en la alteración del patrón y/o la intensidad de la expresión de genes ya existentes en el genotipo silvestre, y la tercera en la introducción de nuevos genes, que el genotipo silvestre no posee. Se recurre a una u otra dependiendo de cada caso en particular.

Dependiendo de la estrategia que se siga, variará el tipo de construcción de ADN a introducir en las plantas receptoras.

En el caso del silenciamiento génico, una de las tácticas más utilizadas consiste en el empleo de construcciones en horquilla. Estas comprenden dos secuencias autocomplementarias separadas por una corta secuencia, que en ocasiones puede ser un intrón (**Figura I 5**) (**Smith et al., 2000**). Otra de las metodologías más extendidas consiste en el empleo de microARNs artificiales (**Schwab et al., 2006**). A través de estas tácticas se han conseguido plantas con una mayor resistencia frente a diferentes tipos de organismos, tales como hongos (**Nowara et al., 2010**) y virus (**Pandolfini et al., 2003; Zrachya et al., 2007**).



Figura I 5.- Construcción en horquilla, constituida por dos secuencias autocomplementarias separadas por un intrón. Imagen tomada de **Smith et al. (2000)**.

La segunda estrategia consiste en la introducción de genes de la propia planta para conseguir que su patrón de expresión y/o la intensidad con que se expresan sea diferente que en el tipo silvestre (**Cao et al., 1998**). Por último, la tercera estrategia se basa en la introducción de genes que el tipo silvestre no posee (**Brogue et al., 1991**), y cuyo origen puede ser vegetal o no.

I 2.3. Optimización de las construcciones empleadas en transformación genética

Independientemente de la estrategia empleada para la obtención de las líneas resistentes, la expresión de la secuencia introducida estará controlada por un promotor y un terminador. Estos elementos son muy importantes, dado que determinarán el patrón e intensidad de su expresión en el vegetal transgénico. De tal modo que, el mero uso de un promotor y/o un terminador inadecuados para ese caso en particular, puede llevar al fracaso del programa de mejora (**Gurr y Rushton, 2005a**).

En los últimos años se han caracterizado una amplia variedad de promotores de diferentes orígenes (**Figura I 6**), y se ha comprobado su idoneidad para promover la expresión de transgenes en plantas transformadas genéticamente (**Yoshida y Shinmyo, 2000; Lessard et al., 2002**).

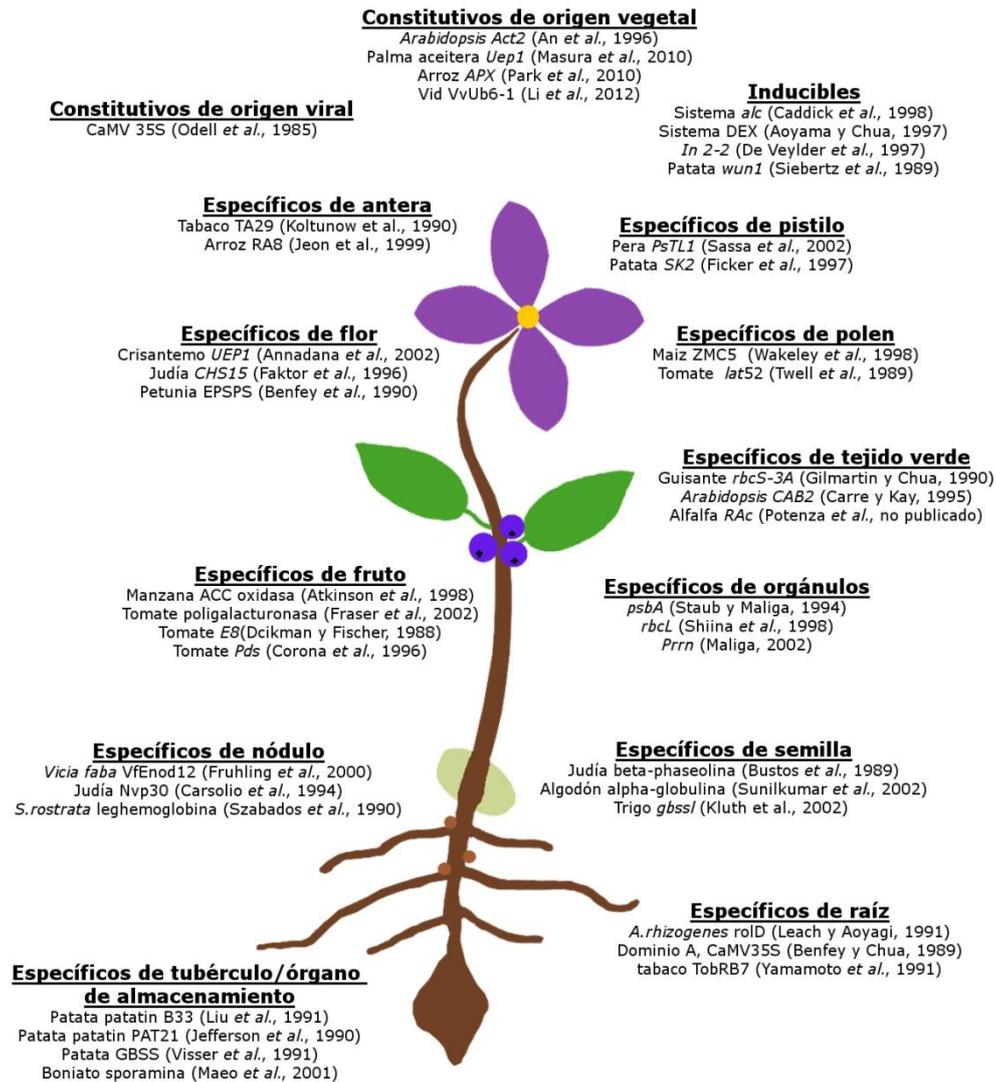


Figura I 6.- Diagrama de una planta en el que se indican varios promotores caracterizados. Estos conducen a diferentes patrones de expresión en la planta, que pueden ir desde la expresión específica en un solo órgano, tejido o incluso orgánulo, a la expresión del gen en prácticamente toda la planta, independientemente del estado de desarrollo y condiciones externas, como ocurre cuando un gen se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo. Por otra parte, los genes que se encuentran bajo el control de promotores inducibles solo se expresan ante la presencia del estímulo inductor. Imagen modificada de **Potenza *et al.* (2004)**.

Estos promotores se dividen en 4 tipos.

Promotores constitutivos. Dirigen la expresión en virtualmente todos los tejidos y de forma prácticamente independiente de factores ambientales o del desarrollo. Unos de los más utilizados en transformación genética de plantas son el promotor CaMV35S (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor) (**Odell *et al.*, 1985; Kay *et al.*, 1987**) y el promotor del gen de la actina 1 de arroz (*Oryza sativa* L.) (**McElroy *et al.*, 1990**).

Promotores específicos de tejido o específicos de estadio del desarrollo. Dirigen la

expresión del gen en un tejido o tejidos específico/s, o en determinadas fases del desarrollo.

Promotores inducibles. El patrón de expresión del gen controlado por ellos no va a depender de factores endógenos, sino de condiciones ambientales y estímulos externos, que pueden ser controlados de forma artificial. Podemos encontrar desde promotores modulados por factores abióticos, tales como luz, niveles de oxígeno, calor, frío... hasta promotores modulados por compuestos químicos, tales como antibióticos, cobre, alcoholes... (Padidam, 2003).

Promotores sintéticos. Promotores creados por ingeniería genética, uniendo a los elementos mínimos necesarios para el inicio de la transcripción (*core promoter* o núcleo del promotor), los elementos reguladores deseados en posición *cis* (Venter, 2007) (Figura I 7).

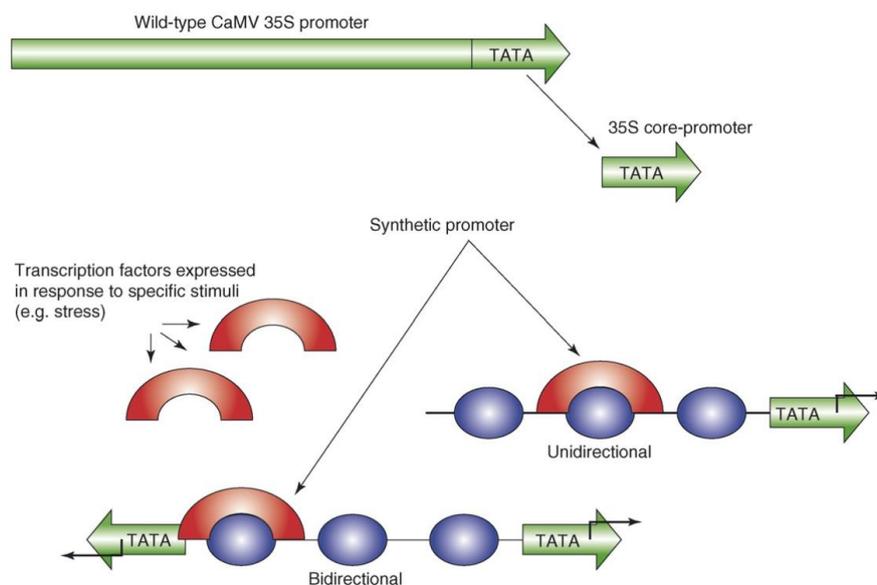


Figura I 7.- Representación simplificada de un promotor sintético de plantas. Los promotores sintéticos están constituidos por el *core promoter*, que contiene la caja TATA (flecha verde) de un promotor constitutivo, como puede ser el CaMV35S, y que es esencial para el inicio de la transcripción. Aguas arriba se sitúan motivos en *cis* para el control de la expresión (elipses azules). A estos motivos reguladores podrán unirse factores de transcripción (arcos rojos), que se expresan en respuesta a estímulos específicos, y así modular la expresión del transgén. Imagen tomada de Venter (2007).

Tradicionalmente, todos los esfuerzos en cuanto al control de la expresión de la secuencia introducida se centraban en la elección del promotor más adecuado, obviando la importancia que tiene el terminador en este cometido. Sin embargo, los transcritos terminados de forma aberrante actúan como eficientes inductores de procesos de silenciamiento génico (Nicholson y Srivastava, 2009), de aquí la importancia de

I-Introducción

seleccionar también un terminador adecuado. Otra muestra de la influencia del terminador es que, aun empleando un mismo promotor, su combinación con un terminador u otro puede conducir a diferentes niveles de expresión (**Nagaya *et al.*, 2010; Luo y Chen, 2007**).

Otro punto a tener en cuenta, y no menos importante, a la hora de decidir qué secuencias reguladoras acompañarán al transgén, es el papel regulador que en muchos casos desempeñan las regiones 5'UTR (*untranslated region*) y 3'UTR de los genes, pudiendo ser importante sumarlas al promotor y al terminador, respectivamente. Además, estas regiones pueden ejercer su papel regulador a varios niveles: transcripcional, post-transcripcional y/o a nivel de la traducción.

Un ejemplo de la importancia de las 3'UTR lo muestran los trabajos de **Simon y Sengupta-Gopalan (2010)** y de **Ortega *et al.* (2006)**, que demuestran que la caída, debida a la presencia de una fuente de nitrógeno, observada en los niveles de los transcritos de genes que codifican para glutamina sintetasa citoplasmáticas, está mediada por la 3'UTR de dichos genes. Por otra parte, **Yang *et al.* (2009)** expresaron en arroz el gen para el alérgeno mDer f 2 del ácaro del polvo, bajo el control del promotor del gen de la ubiquitina de maíz (*Zea mays ssp. mays* L.). En una de las construcciones emplearon como terminador el del gen de la nopalina sintasa (*nos*) de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend 1907) Conn 1942, y en la otra el del gen *GluB-1* (incluyendo la 3'UTR), que codifica para la proteína de arroz glutelina B-1, una proteína de almacenamiento. Observaron que la acumulación del alérgeno en las semillas y hojas de arroz transgénicas era mayor empleando el terminador de *GluB-1* que el terminador *nos*, esto se hacía especialmente notable en el caso de las semillas. Además vieron que el nivel de expresión de *mDer f 2* en las hojas era el mismo tanto empleando el terminador *nos* como el de *GluB-1*. En semillas, los niveles de expresión de *mDer f 2* eran mayores en los casos en que iba acompañado del terminador de *GluB-1*, pero esta diferencia era menor que la observada si lo que comparaban eran los niveles de proteína mDer f 2. Por otra parte, vieron que en las semillas de las plantas transgénicas en que la expresión del gen del alérgeno era controlada por el terminador de la glutelina, los ARNm de mDer f 2 mostraban tan solo dos posibles lugares de poliadenilación y estos coincidían con los de los ARNm de la proteína nativa GluB-1. Sin embargo, en las hojas de estas plantas los transcritos mostraban múltiples lugares de poliadenilación. En las plantas en que la expresión de *mDer f 2* estaba controlada por el terminador *nos*, sus transcritos también mostraron una gran variabilidad en los sitios de

poliadenilación, tanto en las semillas como en las hojas. En conjunto, estos datos apoyan la influencia del terminador que acompaña a *mDer f 2* sobre la acumulación de la proteína para la que codifica. Además, los autores ponen de relieve el papel regulador de la 3'UTR de *GluB-1*, e indican que factores específicos de tejido podrían estar regulando la acumulación del alérgeno a través de su interacción con motivos de esta 3'UTR.

De acuerdo con todo lo anteriormente enunciado, queda demostrada la importancia de elegir cuidadosamente las secuencias reguladoras que controlarán la expresión del transgén. Una consideración a tener en cuenta al tomar esta decisión, es el organismo de procedencia de esas secuencias reguladoras. Aunque el uso de los promotores y terminadores de origen viral y bacteriano está muy extendido en biotecnología vegetal, en los últimos años cobran cada vez más importancia las secuencias de origen vegetal.

Uno de los mayores problemas en los experimentos de transformación genética es el silenciamiento de la secuencia introducida. En ocasiones, este se produce porque el transgén se ha insertado en una región de heterocromatina (**Bhat y Srinivasan, 2002**), pero existen otras causas que pueden desencadenar el silenciamiento génico.

Una de ellas radica en el uso de secuencias reguladoras de origen viral/bacteriano para controlar la expresión del transgén. Promotores virales, como el CaMV35S, son promotores que conducen a la producción de un número muy grande de transcritos, lo que puede desencadenar el silenciamiento como mecanismo de protección de la célula (**Lindbo et al., 1993; Vaucheret et al., 1998; Schubert et al., 2004**). También, una alta tasa de transcripción aumenta la probabilidad de que se generen ARNm aberrantes, debido a una terminación incorrecta (**Luo y Chen, 2007**).

Otros autores, sin embargo, indican que son características cualitativas, y no cuantitativas, las que desencadenan estos fenómenos de silenciamiento, argumentando que en las plantas existen genes que se expresan a niveles muy altos y estos no son silenciados, como sí ocurre con los transgenes. De hecho, existen datos en la literatura que subrayan la habilidad de las células para reconocer características cualitativas de las secuencias introducidas, que les permiten reconocerlas como foráneas e inactivarlas (**Rajeevkumar et al., 2015**). Las investigaciones de **Dadami et al. (2013)** también apoyan esta hipótesis, indicando que la resistencia al silenciamiento de genes endógenos que se expresan a niveles muy altos parece estar basada en rasgos de sus promotores, 5'UTR, terminadores, 3'UTR y en la presencia de intrones.

Independientemente de si son características cuantitativas o cualitativas, o una

I-Introducción

combinación de ambas, las desencadenantes de los fenómenos de silenciamiento génico, todas estas hipótesis apuntan a que el uso de secuencias reguladoras de origen vegetal favorece el no silenciamiento del transgén.

Dejando a un lado las posibles ventajas y desventajas que puede conllevar el uso de los distintos tipos de secuencias reguladoras en cuanto al patrón, estabilidad e intensidad de la expresión del gen introducido, otro punto en el que estas secuencias pueden influir sobre el éxito del programa de mejora, es en lo que respecta a la aceptación de los vegetales transgénicos por parte de la población. La introducción de secuencias de origen viral y/o bacteriano en los vegetales transgénicos es uno de los mayores motivos de rechazo hacia estas plantas, de este modo, el empleo exclusivamente de secuencias de origen vegetal en la transformación genética podría conseguir una mayor aceptación de estos vegetales (**Rommens, 2004**).

I 2.3.1 Intragénesis y cisgénesis

Los organismos genéticamente modificados constituyen una buena alternativa a aquellos obtenidos a través de programas de mejora tradicional, sin embargo, entre el público en general, existe un gran escepticismo hacia estos. Diferentes estudios muestran que las causas de esto podrían asociarse, en gran medida, a la introducción de elementos genéticos de diverso origen en organismos que de antemano no poseían estas secuencias y que no podrían adquirirlas mediante cruces naturales, lo que, en muchas ocasiones, va ligado al miedo por potenciales riesgos para la salud y por la liberación de nuevas combinaciones génicas al medio (**Holme et al., 2013; Telem et al., 2013**).

Para hacer frente a estos obstáculos nacen dos nuevos conceptos, alternativos a la transgénesis, la intragénesis y la cisgénesis. Ambos están basados en la idea de emplear material genético de la misma especie, o de especies cercanas capaces de hibridación sexual, en contraste con la transgénesis, donde las secuencias de ADN introducidas pueden tener cualquier origen.

Existen diferentes definiciones para los conceptos de cisgénesis e intragénesis, si bien, a grandes rasgos, se puede decir que la intragénesis implica la introducción de secuencias codificantes del *pool* genético sexualmente compatible de la planta receptora, sin necesidad de contener los intrones. Estas secuencias irían acompañadas de promotores, terminadores y espaciadores del *pool* genético sexualmente compatible de la planta receptora, sin ser necesario que sean los propios del gen al que acompañan (**Conner et al., 2007; Conner et al., 2010; Joshi et al., 2011**). Como diferencias, la cisgénesis

implica que la secuencia del gen debe incluir los intrones y debe ir acompañada de su propio promotor y terminador (**Schouten *et al.*, 2006**).

En ambos casos se busca la no presencia de genes marcadores y secuencias del vector. Incluso algunos autores instan al uso de vectores construidos a partir de secuencias de la propia especie, o de otra especie perteneciente al mismo grupo de compatibilidad sexual (**Conner *et al.*, 2007**).

Han sido muchas las técnicas desarrolladas para poder obtener plantas cis/intragénicas, sin presencia de genes marcadores y secuencias del vector. Algunas de ellas implican la transformación sin uso de gen de selección (**De Vetten *et al.*, 2003; Weeks *et al.*, 2008**), o delección del gen de selección mediante recombinación específica de sitio (**Schaart *et al.*, 2004; Vanblaere *et al.*, 2011**). Otra alternativa consiste en llevar a cabo una co-transformación, para lograr la integración del gen de selección y del gen de interés en posiciones no ligadas en el genoma de la planta, permitiendo la segregación de los dos genes de forma independiente y, por tanto, la obtención de descendientes que solo porten el gen de interés (**Holme *et al.*, 2012; Gadaleta *et al.*, 2008**).

A pesar de sus múltiples ventajas, la cisgénesis e intragénesis cuentan con una serie de limitaciones frente a la transgénesis, asociadas a la necesidad de aislar y caracterizar secuencias del *pool* genético sexualmente compatible de la especie receptora. He aquí la importancia de la caracterización de nuevas secuencias de promotores y terminadores de especies vegetales, sobre todo de aquellas de alto valor agronómico.

I 2.4. Posibles dianas para la obtención de líneas resistentes a patógenos

Las plantas poseen diferentes niveles de defensa, desde las barreras estructurales y compuestos antimicrobianos preformados, a complejas respuestas que se desencadenan al entrar en contacto con el patógeno (**Veronese *et al.*, 2003**).

Decidir cuál o cuáles serán los genes diana del programa de mejora no es una tarea sencilla, ya que habrá que tener en cuenta múltiples factores en lo que concierne a la interacción que se establece entre la planta y el patógeno, así como a la propia biología de cada uno de los organismos. Además habrá que tener en cuenta otras cuestiones, como por ejemplo si se desea una resistencia muy selectiva o de amplio espectro.

En la creación de líneas resistentes a patógenos las estrategias más generalizadas, en lo que concierne a la elección del gen o genes diana, son las que siguen.

I-Introducción

Utilizar un gen diana implicado en la percepción del patógeno por parte de la planta. En este apartado se encuentran los genes de resistencia o genes *R*. El producto de estos genes interacciona, directa o indirectamente, con el producto de los genes de avirulencia (*Avr*) del patógeno y esto desencadena una amplia gama de mecanismos defensivos (**Hammond-Kosack y Parker, 2003**). Gran parte de los genes *R* codifican proteínas de tipo NB-LRR (*nucleotide binding leucine-rich repeat*) (**Jones, 2001**). Las proteínas *R* son generalmente muy específicas, confiriendo resistencia frente a un patógeno determinado (**Thomma et al., 2011**). Estos genes son muy efectivos a la hora de conferir resistencia frente a patógenos, sin embargo, cuentan con tres limitaciones importantes: su alta especificidad, el hecho de que en numerosas ocasiones no son capaces de desencadenar respuestas defensivas en especies vegetales diferentes a la de origen y que generalmente la resistencia que confieren fácilmente se pierde en el tiempo (**Gurr y Rushton, 2005b**).

Las plantas cuentan con otro sistema de detección de los patógenos menos específico. Los componentes de este sistema son capaces de reconocer moléculas altamente conservadas dentro de un grupo de microorganismos, y que poseen una función esencial en su supervivencia o *fitness*, a estas moléculas se las conoce como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (**Chisholm et al., 2006**). Un ejemplo dentro de este sistema es el del receptor FLS2 de *Arabidopsis thaliana*, capaz de reconocer la flagelina y, por tanto, activador de respuestas defensivas frente a enfermedades de origen bacteriano (**Zipfel et al., 2004**).

Usar un gen diana que codifique para un componente del patógeno reconocible por la planta. El reconocimiento de estas moléculas conduce a la activación de las respuestas defensivas en la planta. La dificultad de esta aproximación radica en el control de la expresión del transgén, dado que la mejor opción es usar un promotor inducible por patógeno, para limitar esas respuestas defensivas a los lugares y momentos de infección. Un ejemplo exitoso fue el de la generación de líneas transgénicas de tabaco que poseían una fusión entre el promotor inducible por patógeno del gen de tabaco *hsr203J* y el gen de *Phytophthora cryptogea* Pethybr. y Laff. que codifica el elicitor cryptogein. Bajo condiciones de no-inducción, el transgén no se expresaba y no se detectaba presencia de cryptogein en las plantas transgénicas. Sin embargo, la infección de estas plantas con el hongo *Phytophthora parasitica* Dastur var. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker estimulaba la producción de cryptogein, que coincidía con una rápida inducción de genes implicados en defensa en el punto de infección y áreas circundantes. También se

observaba en esas áreas una necrosis localizada que restringía el avance del patógeno. Estas líneas transgénicas mostraban, además, una mayor resistencia a otros patógenos fúngicos no relacionados con las especies del género *Phytophthora*, tales como *Thielaviopsis basicola* (Berk. y Broome) Ferraris, *Erysiphe cichoracearum* DC. y *Botrytis cinerea* (Keller *et al.*, 1999).

Genes diana que codifican para proteínas capaces de inhibir factores de patogenicidad.

Muchos patógenos, sobre todo los necrótrofos, producen grandes cantidades de factores de patogenicidad, como pueden ser toxinas y enzimas que degradan las paredes celulares, que contribuyen en gran medida al éxito en el establecimiento de la infección (Wally y Punja, 2010a). Un ejemplo dentro de este apartado es la obtención de líneas transgénicas que producen proteínas inhibidoras de poligalacturonasas. Algunos patógenos producen endo-poligalacturonasas, que son secretadas en etapas muy tempranas del proceso de infección y que participan en la degradación de las pectinas. Para contraatacar la actividad de estas enzimas, las plantas poseen proteínas inhibidoras de poligalacturonasas, que inhiben su actividad despolimerizadora (Kalunke *et al.*, 2015). La expresión del gen de la proteína inhibidora de poligalacturonasas PvPGIP2 de *Phaseolus vulgaris* L. en plantas transgénicas de tabaco y *Arabidopsis*, lleva a la restricción de la colonización por *Botrytis cinerea* debido a su efecto inhibitorio sobre la endo-poligalacturonasa BcPG1 del hongo (Manfredini *et al.*, 2005).

Uso de la tecnología del ARNi (ARN interferente) para silenciar la expresión de genes del patógeno en las plantas. Esta estrategia se ha empleado sobre todo para la obtención de líneas resistentes a virus (Ibrahim y Aragão, 2015). Un ejemplo es el desarrollo de líneas transgénicas de *Phaseolus vulgaris* en que se introdujo una construcción en horquilla con intrón para inducir el silenciamiento del gen *ACI* (codifica para una proteína esencial para la replicación del genoma viral) del virus del mosaico dorado de la judía (Bonfim *et al.*, 2007).

Manipulación de la expresión de genes implicados en rutas de señalización. Este es el caso de genes de factores de transcripción o de proteínas kinasas. El mayor inconveniente de esta aproximación es el alto coste que supone para la planta la puesta en marcha de todas estas respuestas, y la posibilidad de efectos colaterales sobre otras características de la planta. Esto puede subsanarse empleando promotores inducibles por patógeno (Gurr y Rushton, 2005b; Wally y Punja, 2010a). Dentro de los factores de transcripción implicados en respuestas defensivas un ejemplo son los WRKY (Pandey y Somssich, 2009), entre las proteínas kinasas cabe resaltar el papel de las MAPK

I-Introducción

(*mitogen-activated protein kinase*) (**Rasmussen et al., 2012**).

Genes diana implicados en biosíntesis o percepción de hormonas. Las hormonas vegetales etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico juegan un papel determinante en la regulación de las respuestas defensivas de las plantas. Además, se ha encontrado recientemente que otras hormonas como auxinas, ácido abscísico, citoquininas, giberelinas y brasinosteroides, que habían sido ampliamente descritas como reguladoras del crecimiento y desarrollo de la planta, también participan en la regulación de las respuestas defensivas (**Denancé et al., 2013**). La modificación del balance/percepción de estas hormonas se ha visto que, en muchos casos, incrementa la resistencia frente a patógenos, sin embargo, son muy comunes efectos colaterales como pérdida de *fitness* y defectos en el crecimiento y desarrollo (**Denancé et al., 2013**).

Generar una respuesta hipersensible (RH) artificial, provocando una muerte celular local por la producción de un producto tóxico. Esta estrategia es complicada por la dificultad de que la RH artificial esté totalmente confinada a los lugares y momentos de la infección. Un ejemplo es el descrito en el trabajo de **Strittmatter et al. (1995)**, cuya estrategia se basaba en la generación de lesiones necróticas en los lugares de infección, del mismo modo que ocurre de forma natural en la muerte celular hipersensible, empleando un promotor inducible por patógeno para controlar la expresión del gen de la ribonucleasa bacteriana barnasa.

Tabla I 1. Familias conocidas de proteínas PR (*pathogenesis-related*).

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Cbia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Cbid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pim</i> ')
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Cbib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Cbic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Tbi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

Tomado de **Van Loon et al. (2006)**.

Genes diana que codifican para péptidos con actividad antimicrobiana, proteínas PR (*pathogenesis-related*) y proteínas implicadas en la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana. Las proteínas PR desempeñan funciones muy diversas (**Tabla I 1**), por ejemplo las quitinasas (PR-3, 4, 8 y 11) participan en la degradación de las paredes celulares fúngicas (**Punja y Zhang, 1993**), y las defensinas (PR-12) y las thioninas (PR-13) poseen actividad antimicrobiana (**Thomma *et al.*, 2002; Bohlmann y Broekaert, 1994**). También dentro de las proteínas PR (PR-9) se encuentran peroxidases que participan en el refuerzo de la pared celular vegetal (**Van Loon *et al.*, 2006**). Otros posibles genes diana son aquellos que codifican para péptidos con actividad antimicrobiana. Este es el caso de Snakin-1 (SN1), un péptido aislado de tubérculos de patata (*Solanum tuberosum* L.) que es activo a concentraciones menores de 10 μ M frente a patógenos fúngicos y bacterianos de patata y otras especies vegetales (**Segura *et al.*, 1999**). Por último, otra opción es la del empleo de un gen que participe en la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana. Un ejemplo de esta estrategia se recoge en el trabajo de **Schmidlin *et al.* (2008)**, en que mediante la co-expresión en *Nicotiana benthamiana* Domin del gen de una resveratrol *O*-metiltransferasa de vid y del de una estilbeno sintasa, también de vid, los autores lograron que esas plantas acumulasen en sus tejidos pterostilbeno, un potente fungitóxico.

Genes diana implicados en la síntesis de barreras físicas. Las paredes celulares son, generalmente, el primer obstáculo que se encuentran los patógenos, desempeñando un importante papel como barrera física. Estas estructuras están formadas, a grandes rasgos, por un entramado de microfibrillas de celulosas, hemicelulosas y pectinas, a las que pueden unirse, en el caso de células que ya han cesado su crecimiento, las ligninas (**Figura I 8**). Las paredes celulares son heterogéneas y dinámicas en cuanto a su composición y estructura, y sus características influyen en su función como barrera defensiva (**Malinovsky *et al.*, 2014**). Uno de los polímeros que juega un papel importante son las ligninas, confiriendo resistencia frente a la degradación y penetración, además de limitar la difusión de toxinas y enzimas desde el patógeno a las células huésped y el tránsito de agua y nutrientes desde las células del huésped al patógeno (**Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Vance *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 2007**).

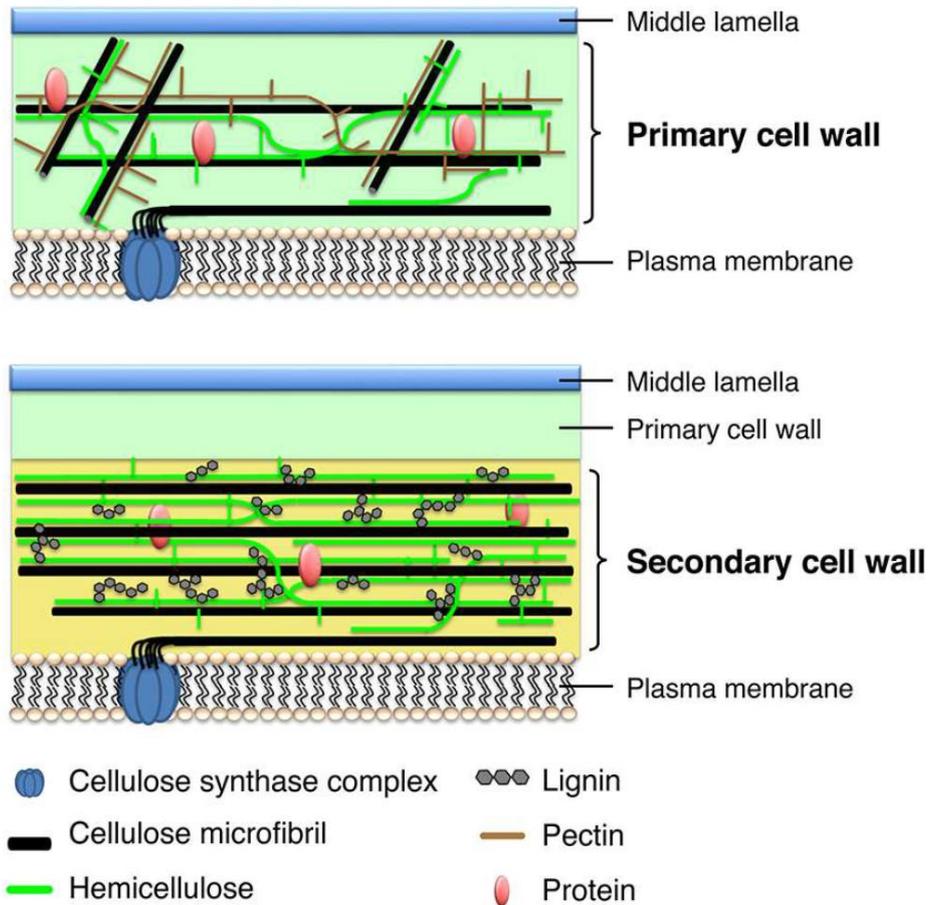


Figura I 8.- En la parte superior de la imagen se observa una representación de la estructura de la pared celular primaria. En ella, las microfibrillas de celulosas son relativamente cortas y delgadas, comparado con las de las paredes celulares secundarias. La principal hemicelulosa en las paredes celulares primarias es el xiloglucano, y estas paredes son ricas en pectinas. En la parte inferior de la imagen se muestra una representación de la pared celular secundaria. Estas paredes son depositadas entre la pared celular primaria y la membrana plasmática. Las paredes celulares secundarias contienen principalmente microfibrillas de celulosas largas y gruesas, la hemicelulosa xilano y ligninas. Imagen tomada de **Nakano *et al.* (2015)**.

I 3. Alteración de las ligninas de la vid como posible estrategia defensiva frente a afecciones de la madera

I 3.1. Las ligninas

Las ligninas son heteropolímeros tridimensionales que resultan del acoplamiento oxidativo de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (monolignoles): el alcohol *p*-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico, en una reacción mediada por

lacasas y peroxidasas de clase III (Ros Barceló, 1997; Boudet *et al.*, 1995). Esta reacción produce un polímero hidrofóbico ópticamente inactivo (Ralph *et al.*, 2004b) compuesto por unidades H (*p*-hidroxifenilo), unidades G (guaiacilo) y unidades S (siringilo), provenientes de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, respectivamente.

Las ligninas tienen una composición poco definida, que varía enormemente entre especies de plantas, grupos filogenéticos, tipos celulares, estadio del desarrollo e incluso bajo diferencias en las condiciones ambientales y exposición a ciertos estreses.

Tanto en las ligninas de las gimnospermas como en las de las angiospermas están presentes las unidades H, G y S (Novo-Uzal *et al.*, 2013). A grandes rasgos, podría decirse que mientras que las ligninas de las gimnospermas están compuestas principalmente por unidades G, con una menor proporción de unidades H, las ligninas de las angiospermas están en general compuestas de niveles similares de unidades G y S (Higuchi, 1990). Sin embargo, esto es solo una generalidad y dentro de cada grupo taxonómico existe una gran variabilidad en la composición de las ligninas. Así por ejemplo, podemos encontrarnos con gimnospermas en que predominan las unidades S y angiospermas cuyas ligninas son principalmente de tipo G (Lewis y Yamamoto, 1990).

Las ligninas se depositan principalmente en las paredes celulares secundarias de determinadas células, tales como fibras, vasos del xilema, traqueidas y esclereidas (Ros Barceló *et al.*, 2004). A mayores de su principal función, la de conferir rigidez y sostén, este polímero juega un papel muy importante como barrera estructural, en la defensa de la planta frente a patógenos, tanto dentro de los mecanismos de defensa constitutivos como de los inducidos.

I 3.2. Papel de las ligninas en la defensa constitutiva e inducida de las plantas

Las ligninas constitutivas representan una barrera que ofrece gran resistencia a la degradación y penetración por parte de los patógenos. Contribuyen al impermeabilizado de las paredes, haciéndolas menos accesibles a enzimas degradadoras de la pared, además, las ligninas pueden prevenir la difusión de toxinas y enzimas desde el patógeno a las células vegetales y la transferencia de agua y nutrientes desde las células huésped al patógeno (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Vance *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 2007). Tanto es así, que en numerosas ocasiones se ha observado una correlación

I-Introducción

positiva entre el contenido en ligninas de la planta y su resistencia a patógenos (**Fossdal et al., 2012; Du et al., 2011**).

También existen evidencias del importante papel de las ligninas en los mecanismos de resistencia inducida de muchas especies vegetales. Por ejemplo, la deposición inducida de ligninas es importante en la formación de las *papillae* en los lugares donde los hongos patógenos intentan penetrar las células vegetales (**Bhuiyan et al., 2009**).

En la línea Prelude-Sr5 de *Triticum aestivum* L., altamente resistente al hongo *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erics. y E. Henn., se ha visto un nexo entre la inducción de lignificación y la muerte celular como un mecanismo para restringir el crecimiento del hongo (**Moerschbacher et al., 1990; Menden et al., 2007**).

Por otra parte, en arroz OsRac1, una GTPasa pequeña Rac/Rop que juega un importante papel como activadora de respuestas defensivas, es capaz de controlar la síntesis de ligninas, apuntando a que la lignificación formaría parte de los mecanismos de resistencia inducida en esta especie (**Kawasaki et al., 2006**).

También existen datos en algodón (*Gossypium* spp.) que corroboran la importancia de la lignificación inducida dentro de las respuestas defensivas de las plantas. Así, el cultivar resistente *Gossypium barbadense* L. cv. 7124 inoculado con *Verticillium dahliae* Kleb. muestra un incremento mayor y más rápido en la expresión de genes implicados en la síntesis de ligninas, comparado con el cultivar susceptible *Gossypium hirsutum* L. cv. YZ-1. El cultivar resistente también muestra un mayor aumento en los niveles de ligninas 14 días tras la inoculación (**Xu et al., 2011**). Resultados similares fueron obtenidos con líneas resistentes y susceptibles de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inoculadas con *Verticillium dahliae* (**Gayoso et al., 2010**).

Dentro de los mecanismos de defensa de las plantas, no solo es importante el contenido en ligninas o la inducción de su síntesis, sino también la composición de las mismas. Un ejemplo de esto se refleja en el trabajo realizado por **Lionetti et al. (2015)** en *Triticum* spp. En él señalan la existencia de diferencias en la composición monomérica de las ligninas entre líneas resistentes y susceptibles. Por otra parte, **Pomar et al. (2004)** analizaron la composición de las ligninas de tallos de *Capsicum annuum* L. (var. *annuum*) cv. Padrón, tolerante a *Verticillium dahliae*, observando diferencias entre plantas sanas y plantas afectadas por este patógeno.

I 3.3. Síntesis de ligninas

La ruta completa de biosíntesis de las ligninas, hasta el momento de su deposición en las paredes celulares, muestra aún a día de hoy algunos vacíos, debido a que no existe un tejido o especie vegetal donde se haya caracterizado en su totalidad. De modo que los datos con que se cuenta son el resultado del estudio concreto de ciertos pasos específicos, en diversas especies y tejidos vegetales (**Boerjan et al., 2003, Ralph et al., 2004a, Ralph et al., 2008, Vanholme et al., 2010, Zhao y Dixon, 2011**).

La biosíntesis de las ligninas se desarrolla a través de una larga secuencia de reacciones que implican tres rutas.

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

La ruta común fenilpropanoide (Figura I 9). Desde L-fenilalanina (y/o L-tirosina) hasta *p*-hidroxicinamoil-CoA. Las enzimas que participan en esta ruta son la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), la hidroxicinamoil-CoA siquimato:quinato hidroxicinamoil transferasa (HCT), la *p*-cumaroilsiquimato 3'-hidroxilasa (C3'H) y las *O*-metil-transferasas (OMT) dependientes de *S*-adenosil-*L*-metionina, tales como la cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa (CCoAOMT) y la *p*-hidroxicinamato CoA ligasa (4CL). Los productos finales de esta ruta, los ésteres CoA de los ácidos cinámicos, son los precursores de las ligninas, pero también de otros compuestos fenólicos como los flavonoides y los taninos, que se acumulan en grandes cantidades en las células vegetales.

La ruta específica de la biosíntesis de las ligninas (Figura I 9). Conduce el *p*-hidroxicinamoil-CoA hacia la síntesis de los alcoholes cinamílicos. Estas dos reacciones son catalizadas por las enzimas *p*-hidroxicinamoil-CoA reductasa (CCR) y *p*-hidroxicinamil alcohol deshidrogenasa (CAD). Intercalada entre estos dos pasos reductores, hay una reacción catalizada por la ferulato 5-hidroxilasa (F5H), que está acoplada con una OMT específica, ácido cafeico *O*-metiltransferasa (COMT), y que permite la síntesis de unidades siringilo (**Fraser y Chapple, 2011**).

Tras su biosíntesis en el citosol, los monolignoles deben transportarse a la pared celular para ser oxidados e incorporados al polímero de lignina. Este transporte se podría realizar de las siguientes maneras: mediante exocitosis a través de vesículas, difusión pasiva o transporte activo mediante transportadores ABC (*ATP-binding cassette*).

I-Introducción

Siendo este último tipo de transporte el más aceptado actualmente para el paso de los monolignoles desde el citosol a la pared celular (Miao y Liu, 2010). Además, el descubrimiento de un transportador ABC específico para el transporte de alcohol *p*-cumarílico podría ser indicativo de un posible papel de los transportadores ABC en determinar la variación en la composición de las ligninas en diferentes tipos celulares (Alejandro *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

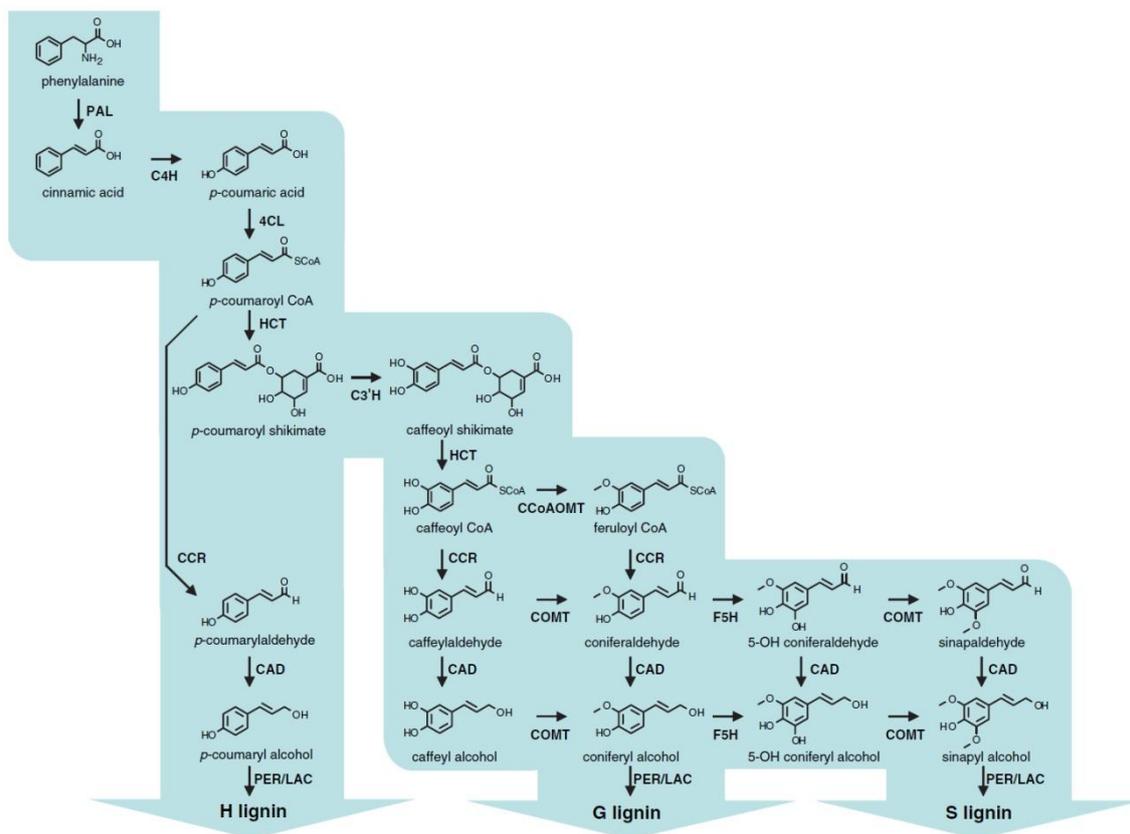


Figura I 9.- Ruta de biosíntesis de las ligninas. Las enzimas que participan en esta ruta son la fenilalanina amonio liasa (PAL), la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), la hidroxicinamoil-CoA shiquimato:quinato hidroxicinamoil transferasa (HCT), la *p*-cumaroylshiquimato 3'-hidroxilasa (C3'H), la cafeoyl-CoA-*O*-metiltransferasa (CCoAOMT), la *p*-hidroxicinamato CoA ligasa (4CL), la *p*-hidroxicinamoil-CoA reductasa (CCR), la *p*-hidroxicinamil alcohol deshidrogenasa (CAD), la ferulato 5-hidroxilasa (F5H), la ácido cafeico *O*-metiltransferasa (COMT), las peroxidasas (PER) y las lacasas (LAC). Imagen tomada de Li *et al.* (2008).

El último paso de la biosíntesis de las ligninas consiste en la polimerización de los monolignoles, a nivel de la pared celular. Esta etapa se inicia con la oxidación de los alcoholes hidroxicinamílicos, que dará lugar a la formación de radicales fenoxilo, seguido de un acoplamiento radical entre los mismos, generando dímeros (dilignoles). A partir de aquí pueden darse dos tipos de polimerización. Por una parte la polimerización lineal, en que los dímeros oxidados se unen con otros monómeros de alcoholes

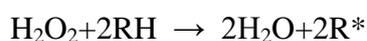
hidroxicinamílicos, produciéndose un polímero en crecimiento (**Vanholme et al., 2010**). Y por otra, la polimerización en masa, en que se produce el acoplamiento oxidativo de dos oligómeros de lignina (**Brunow et al., 1998**). En ambientes metabólicos ricos en alcohol coniferílico predomina la polimerización en masa, mientras que la presencia, a mayores, de alcohol sinapílico favorece la polimerización lineal (**Demont-Caulet et al., 2010**).

Como enzimas responsables de la oxidación de los alcoholes hidroxicinamílicos se apunta tanto a lacasas como a peroxidasas de clase III. Existen hipótesis que señalan que ambos tipos de enzimas participarían en este proceso pero en diferentes etapas, de modo que las lacasas participarían en las primeras etapas de la lignificación (**Zhao et al., 2013**), mientras que las peroxidasas serían las encargadas de la lignificación en los estadios intermedios y finales, cuando se genera H₂O₂ por parte de las células del parénquima, en respuesta a la entrada en apoptosis de las células en lignificación (**Pesquet et al., 2013**). Además, se sabe que los monolignoles oxidados pueden ceder su radical a otros monolignoles, a dilignoles o al polímero de lignina en crecimiento, convirtiendo a la polimerización de los monolignoles en un proceso muy complejo (**Wang et al., 2013**).

I 3.4. Las peroxidasas de clase III como posibles dianas para emprender un programa de mejora de la vid

I 3.4.1 Las peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.X) pueden definirse como enzimas que catalizan la oxidación de varios sustratos, reduciendo peróxido de hidrógeno a agua, según la siguiente reacción



donde RH y R* representan un sustrato reductor y su radical oxidado resultante, respectivamente.

Pueden ser hemo o no-hemo proteínas, y la mayoría de las hemo peroxidasas pertenecen a dos grandes superfamilias: la de las peroxidasas animales y la de las peroxidasas no animales (**Mathé et al., 2010**).

A su vez, la superfamilia de las peroxidasas no animales se divide en tres clases diferentes (clase I, clase II y clase III), basándose en diferencias en su estructura

I-Introducción

primaria (**Welinder, 1992a**).

Dentro de la clase I encontramos la citocromo c peroxidasa mitocondrial de levaduras, la ascorbato peroxidasa cloroplástica y citosólica de plantas superiores y las peroxidases bacterianas (**Jespersen et al., 1997**). No poseen naturaleza glicoproteica, están localizadas en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol, y muestran una moderada especificidad de sustrato para el ácido ascórbico. Son inhibidas por reactivos que contienen el grupo tiol, como el *p*-cloromercurobenzoato. En general son muy termolábiles. Su principal función en la célula es la detoxificación del exceso de H₂O₂ (**Skulachev, 1998; Erman y Vitello, 2002; Shigeoka et al., 2002**).

La clase II agrupa a todas las peroxidases fúngicas de secreción. Aquí se incluyen las lignina peroxidases y las manganeso peroxidases. Su principal función es la degradación de restos del suelo (**Piontek et al., 2001; Martínez et al., 2005**).

La clase III contiene todas las peroxidases vegetales de secreción. Se trata de proteínas de naturaleza glicoproteica, que son secretadas fuera de las células o transportadas a las vacuolas (**Hiraga et al., 2001**). Muestran una baja especificidad de sustrato, con moderada, pero notable, afinidad por el alcohol coniferílico. Presentan una considerable estabilidad térmica.

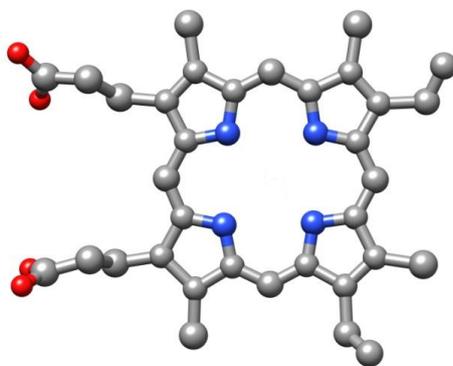


Figura I 10.- Estructura tridimensional de la protoporfirina IX.

Las peroxidases de estas tres clases tienen en común un grupo hemo, formado por protoporfirina IX (**Figura I 10**) y Fe (III), y comparten una estructura tridimensional muy similar (**Welinder, 1992b; Edwards et al., 1993; Smulevich et al., 2006**). Aunque existe una baja homología en cuanto a la secuencia aminoacídica entre las tres clases, existen 5 aminoácidos, posicionados separadamente, que son importantes para la catálisis y estructura, así como para el plegamiento en hélices del polipéptido, y que están estrictamente conservados entre las peroxidases de las tres clases (**Schuller et al., 1996; Gajhede et al., 1997**).

I 3.4.2 Estructura de las peroxidasas de clase III

Las peroxidasas de clase III (EC 1.11.1.7) son glicoproteínas que comprenden una cadena polipeptídica de aproximadamente 300 aminoácidos, Fe (III) protoporfirina IX (grupo hemo) y dos átomos estabilizadores de Ca^{+2} (Veitch, 2004a) (Figura I 11A).

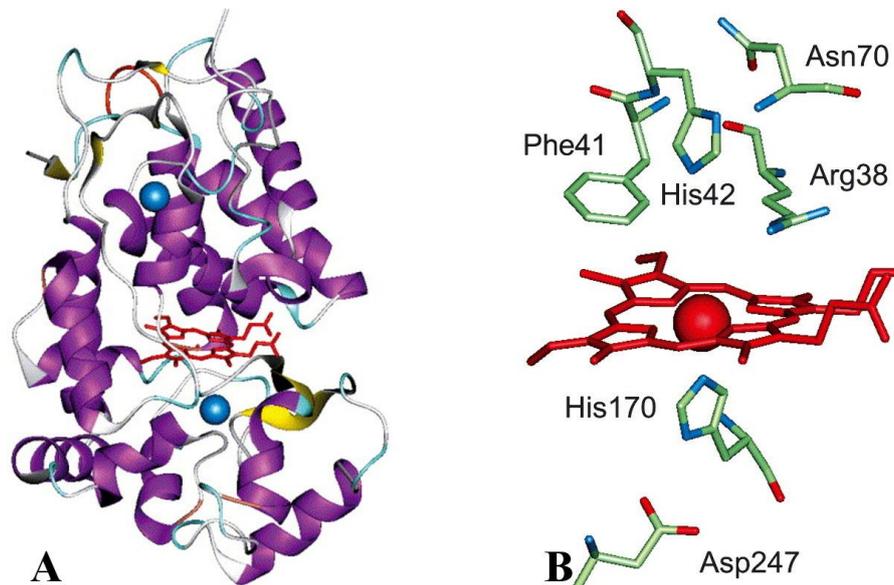


Figura I 11.- A: representación tridimensional de la estructura cristalográfica por rayos-X de la isoenzima C de la peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana* P.Gaertn., B.Mey. y Scherb.) (HRP C). El grupo hemo (en rojo) está localizado entre los dominios distal y proximal, cada uno de los cuales contiene un átomo de calcio (esferas azules). Las regiones de hélices α están en color púrpura, y las de láminas β en amarillo. B: principales residuos aminoacídicos en la región de unión al grupo hemo de la HRP C. El grupo hemo (en rojo) está coordinado por la histidina proximal, His170, y el sexto sitio de coordinación está vacante. Imágenes tomadas de Veitch (2004b).

El grupo hemo está localizado en una cavidad entre dos hélices α antiparalelas. El hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno pirrólicos del grupo hemo y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina de la proteína, que se ha conservado durante la evolución. La sexta posición de coordinación se encuentra libre, determinando así el estado de alto espín para el hierro (Banci, 1997) (Figura I 11B).

Hay residuos conservados que tienen un papel importante, como la histidina distal y la arginina adyacente. El grupo Fe (III) protoporfirina IX, junto con la histidina y la arginina distales son esenciales para la actividad catalítica de las peroxidasas de clase III (Passardi *et al.*, 2004).

En todas las peroxidasas de clase III conocidas hasta el momento se encuentran dos átomos estabilizadores de Ca^{+2} , uno distal y otro proximal. Además, el Ca^{+2} también es considerado un activador de las peroxidasas vegetales de secreción (Converso y

I-Introducción

Fernández, 1996), y las cadenas a las que están unidos los átomos de Ca^{+2} están altamente conservadas (Welinder *et al.*, 2002).

La presencia de cuatro puentes disulfuro ligados a cuatro pares de residuos invariables de cisteína es un rasgo conservado en todas las peroxididasas de clase III, además de la existencia de un puente salino en los residuos invariables de asparragina y arginina, importante para la unión entre los dominios N- y C- terminal durante el plegamiento de la proteína (Veitch, 2004a).

En la estructura tridimensional de las peroxididasas de clase III predominan las hélices α , de hecho, estas peroxididasas poseen 13 hélices α (Figura I 12A) a diferencia de las peroxididasas vegetales de clase I que solo poseen 10 (Passardi *et al.*, 2004).

La mayoría de los ARNm de las peroxididasas vegetales codifican un péptido señal, de entre 19 a 31 residuos, de entrada al retículo endoplasmático, que dirige a la proteína hacia la ruta de secreción. Algunos ARNm también codifican un propéptido carboxi-terminal que puede ser responsable del direccionamiento a vacuola (Welinder *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2008) (Figura I 12B).

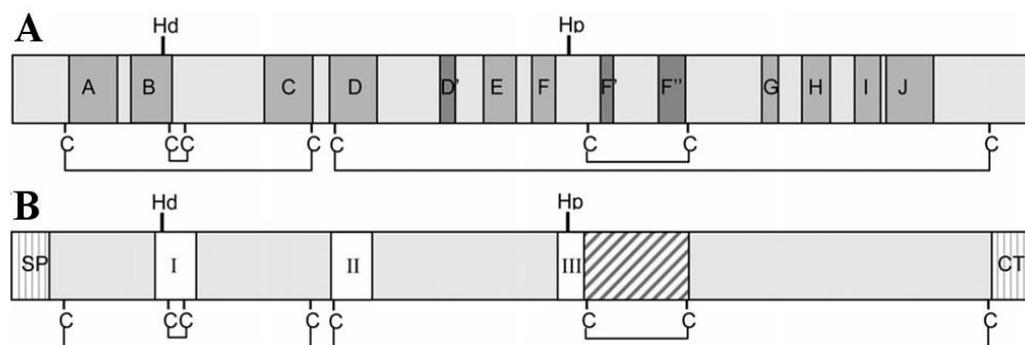


Figura I 12.- Representación esquemática de la estructura de las peroxididasas de clase III. A: estructura secundaria. La posición de las hélices α aparece representada usando como referencia los residuos conservados de cisteína (C) y las histidinas distal (Hd) y proximal (Hp). Las hélices en gris oscuro son específicas de peroxididasas de clase III. Las otras hélices están conservadas entre las peroxididasas de las clases I, II y III. B: estructura primaria. Los dominios altamente conservados I, II y III corresponden con el dominio distal de unión a hemo, un dominio desconocido y el dominio proximal de unión a hemo, respectivamente. La región con rayas en diagonal corresponde a un posible dominio variable responsable de la especificidad catalítica. El péptido señal (SP) y el propéptido carboxi-terminal (CT) son muy variables en cuanto a su longitud y composición aminoacídica. Imagen tomada de **Cosio y Dunand (2009)**.

La glicosilación de estas enzimas varía entre el 0 % y el 25 %. Los principales azúcares de sus oligosacáridos son la N-acetilglucosamina, la fucosa, la xilosa y la manosa, además, resaltar que la mayoría de estos glicanos tienen un alto contenido en este último azúcar (Gray *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; McMannus y Ashford, 1997; Wilson,

2002). La glicosilación ocurre en la superficie de los giros que conectan sobre todo las hélices F' y F'', de tal forma que el glicano se presenta hacia el exterior de la molécula (Veitch, 2004a).

Son muchas las características de las peroxidadas que se ven influidas por la presencia de estos glicanos. De hecho, la glicosilación es uno de los principales factores que determinan la inusual estabilidad térmica de las peroxidadas vegetales de secreción (McEldoon y Dordick, 1996). Además, existen datos de que la eliminación de estos oligosacáridos normalmente también afecta a la cinética de las peroxidadas, a su resistencia a las proteasas (por ejemplo tripsina), a su estructura secundaria y a sus propiedades inmunológicas (Sánchez-Romero *et al.*, 1994; Tams y Welinder, 1995; Duarte-Vázquez *et al.*, 2003).

I 3.4.3 Funciones de las peroxidadas de clase III

Como consecuencia del gran número de genes, isoenzimas y sus dos posibles ciclos catalíticos (Figura I 13), las peroxidadas de clase III están implicadas en un amplio rango de procesos fisiológicos durante el ciclo vital de las plantas (Passardi *et al.*, 2005).

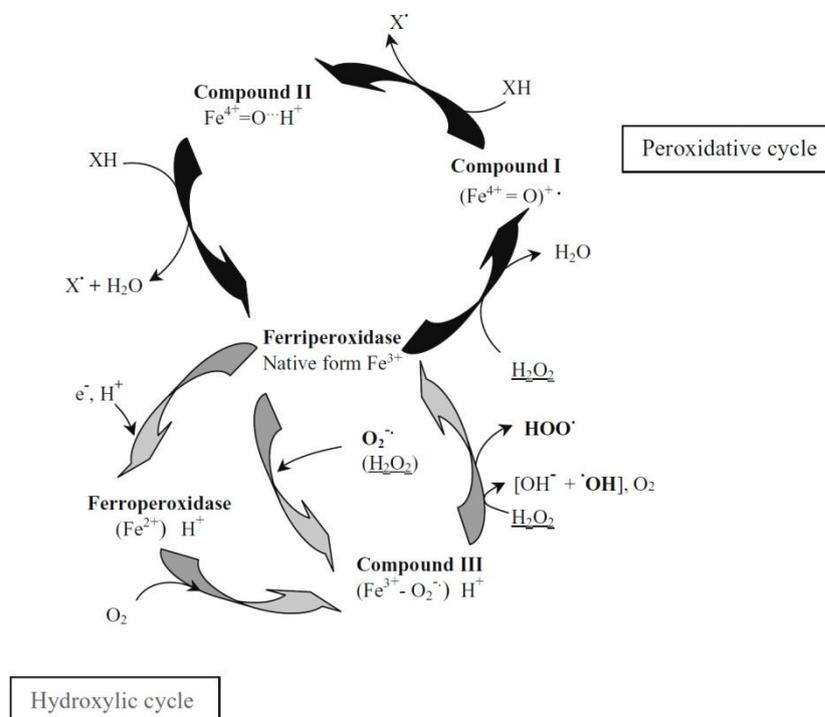


Figura I 13.- Ciclos de reacción de las peroxidadas de clase III. El ciclo hidroxílico (representado con flechas grises) puede regular el nivel de H_2O_2 y generar especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como $\cdot\text{OH}$ y $\text{HOO}\cdot$. El ciclo peroxidativo (representado en negro) puede oxidar varios sustratos (XH) y liberar su forma oxidada (X'). Imagen tomada de Passardi *et al.* (2005).

I-Introducción

Entre estos procesos podemos mencionar el metabolismo de la pared celular (**Barceló y Pomar, 2001; Passardi *et al.*, 2004**), cicatrización de heridas (**Bernards *et al.*, 1999; Allison y Schultz, 2004**), defensa frente a patógenos (**Almagro *et al.*, 2009**), tolerancia a metales (**Chiang *et al.*, 2006**) y elongación celular (**Passardi *et al.*, 2004**).

I 3.4.4 Peroxidasas de clase III en la vid

Las peroxidasas de clase III de la vid son glicoproteínas cuyo peso molecular se encuentra entre los 35-45 kDa, dependiendo de su grado de glicosilación (**Sciancalepore *et al.*, 1985; Liao *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2001**).

Estudios de ESTs (*expressed sequence tags*) revelan que las peroxidasas de clase III están codificadas en las plantas por una gran familia multigénica (**Hiraga *et al.*, 2000**), siendo un grupo de enzimas que muestra un alto grado de polimorfismo, que puede ser estudiado mediante isoelectroenfoque. Estudios en la peroxidasa C de rábano picante (**Green y Oliver, 1991**) sugieren que algunas de las isoenzimas, observadas en el isoelectroenfoque, podrían provenir de un mismo gen, debido a modificaciones post-transcripcionales. En la mayoría de los casos, este polimorfismo varía dependiendo de la variedad e incluso del órgano de la planta. Es por ello que esta característica ha sido utilizada en el pasado como una herramienta en ampelografía (**Bachmann y Blaich, 1988**).

Las peroxidasas de vid son capaces de aceptar una amplia variedad de sustratos, como son la proteína de pared celular extensina (**Jackson *et al.*, 2001**), reguladores del crecimiento como el ácido indolacético (**Mato *et al.*, 1988; Moncousin *et al.*, 1988; García-Florenciano *et al.*, 1991**), fenoles (**Zapata *et al.*, 1992; Ros Barceló *et al.*, 1994**), estilbenos (**Hoos y Blaich, 1988; Morales *et al.*, 1997**), flavonoles (**Morales *et al.*, 1993a**), alcoholes cinamílicos (**Morales *et al.*, 1993b**) y antocianinas (**Calderón *et al.*, 1992**). Esto las convierte en enzimas muy versátiles, implicadas en una amplia variedad de procesos fisiológicos de la vid, que son los siguientes: formación de enlaces cruzados entre extensinas, oxidación de resveratrol y síntesis de viniferinas, *turnover* de compuestos fenólicos de las vacuolas y biosíntesis de ligninas.

En cuanto a esta última función, no existen datos en la literatura acerca de la k_3 (constante cinética de reducción del compuesto II, segunda forma enzimática intermedia de la peroxidasa, ver **Figura I 13**) de peroxidasas de vid para alcohol *p*-cumarílico y alcohol sinapílico, sin embargo, sí se ha encontrado una peroxidasa de vid fuertemente básica que es capaz de oxidar el alcohol coniferílico con valores de k_3 de $8,7 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$

(pH=5,0) (Morales y Ros Barceló, 1997). El valor de la constante k_3 determina la reactividad de la enzima con el sustrato reductor, indicando la idoneidad de un sustrato para una determinada peroxidasa.

Los principales productos de la dimerización del alcohol coniferílico por las peroxidasas son los neolignanos pinosinol, dehidrodiconiferil alcohol y guaiacilglicerol- β -O-coniferil alcohol éter, que han sido considerados como productos intermedios en el ensamblaje macromolecular de las ligninas (Nose *et al.*, 1995). Los dímeros de alcoholes *p*-hidroxicinamílicos pueden ser oxidados por peroxidasas para producir polímeros de lignina, que confieren resistencia a las paredes celulares vegetales e impiden la degradación de los polisacáridos de estas, actuando como la barrera física más importante en la defensa frente a herbívoros, plagas y patógenos.

I 3.4.5 Peroxidasas de clase III y resistencia a patógenos

Aunque no específicamente en el caso de la vid, existen múltiples muestras en la literatura que constatan que la expresión, en plantas genéticamente modificadas, de genes que codifican para peroxidasas de clase III puede conducir a modificaciones cuantitativas o cualitativas de sus ligninas, produciéndose un incremento en la resistencia a patógenos de estas plantas. Así, la expresión del gen que codifica para la peroxidasa catiónica de arroz OsPrx114 en líneas transgénicas de *Daucus carota* L., lleva a que estas plantas sean más resistentes a patógenos foliares necrótrofos. Este incremento en resistencia es debido a una mayor acumulación de transcritos de proteínas PR, rápida eliminación de H_2O_2 durante el estallido oxidativo e incremento en la formación de ligninas (Wally y Punja, 2010b). También se ha visto que en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que expresan el gen de la peroxidasa catiónica ShPx2 de *Stylosanthes humilis* Kunth, el contenido en ligninas es mayor que en los controles no transgénicos y, además, muestran una mayor resistencia a los patógenos necrótrofos *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *Cercospora nicotianae* Ellis y Everh. (Way *et al.*, 2000; Way *et al.*, 2011). Sin embargo, las plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen de la peroxidasa catiónica spi2 de *Picea abies* (L.) Karst. poseen unos niveles de ligninas similares a los de las plantas control, pero sus ligninas muestran ciertas diferencias histoquímicas y de estructura. La frecuencia relativa de grupos finales coniferilaldehído en unidades G con enlaces β -O-4 es ligeramente mayor en las líneas transgénicas comparado con los controles. Además, las secciones transversales de los tallos de los tabacos transgénicos teñidas con floroglucinol

I-Introducción

muestran una coloración roja más intensa que en el caso de las secciones de los tallos de las plantas control. Los tabacos transgénicos también muestran una mayor capacidad para suprimir el crecimiento de la bacteria patógena *Erwinia carotovora* (Jones, 1901) Bergey *et al.*, 1923 (Elfstrand *et al.*, 2002).

Todos estos datos en conjunto apoyan nuestra propuesta, de la sobreexpresión del gen de una peroxidasa de clase III implicada en la síntesis de ligninas como posible estrategia para la obtención de vides transgénicas que muestren una mayor resistencia a los hongos que provocan afecciones de la madera y, también, la importancia que tendría para el sector vitivinícola gallego lograr este cometido. De este modo, se decidió llevar a cabo una evaluación de la potencialidad de esta estrategia, estudio que comprendió tres etapas: aislamiento de un promotor y un terminador de vid adecuados para la expresión constitutiva y a altos niveles de transgenes, identificación y clonación de un gen de vid que codifica para una peroxidasa de clase III implicada en lignificación y confirmación de la participación de esta enzima en la polimerización de los monolignoles y, por último, análisis de las modificaciones que provoca la expresión constitutiva de este gen en plantas transgénicas de *N. tabacum*.

A lo largo de esta memoria se recogen los resultados obtenidos, y se discute la potencialidad de la estrategia para ser usada en la generación de vides transgénicas resistentes a patógenos fúngicos de la madera.

I 4. Bibliografía

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S y Takada Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 24: 2783-2840.

Agrios GN. 1995. Fitopatología. Editorial Limusa. México.

Agudelo-Romero P, Erban A, Rego C, Carbonell-Bejerano P, Nascimento T, Sousa L, Martínez-Zapater JM, Kopka J y Fortes AM. 2015. Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *J Exp Bot* 66: 1769-1785.

Aguín-Casal O, Sáinz-Osés MJ y Mansilla-Vázquez JP. 2004. *Armillaria* species infesting vineyards in northwestern Spain. *Eur J Plant Pathol* 110: 683-687.

Aguín O, Sáinz MJ, Pintos C y Mansilla JP. 2002. Posibilidades de control de *Armillaria mellea* en vid. *Vida Rural* 146: 42-44.

Agustí-Brisach C y Armengol J. 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathol Mediterr* 52: 245-261.

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

Allison SD y Schultz JC. 2004. Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *J Chem Ecol* 30: 1363-1379.

Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A y Pedreño MA. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot.* 60: 377-390.

Andolfi A, Mugnai L, Luque J, Surico G, Cimmino A y Evidente A. 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins (Basel)* 3: 1569-1605.

Armengol J, Vicent A, Torné L, García-Figueres F y García-Jiménez J. 2001. Hongos asociados a decaimientos y afecciones de madera en vid en diversas zonas españolas. *Bol San Veg Plagas* 27: 137-153.

Arroyo-García R, Ruiz-García L, Bolling L, Ocete R, López MA, Arnold C, Ergul A, Söylemezoğlu G, Uzun HI, Cabello F, Ibáñez J, Aradhya MK, Atanassov A, Atanassov I, Balint S, Cenis JL, Costantini L, Goris-Lavets S, Grando MS, Klein BY, McGovern PE, Merdinoglu D, Pejic I, Pelsy F, Primikirios N, Risovannaya V, Roubelakis-Angelakis KA, Snoussi H, Sotiri P, Tamhankar S, This P, Troshin L, Malpica JM, Lefort F y Martínez-Zapater JM. 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Mol Ecol* 15: 3707-3714.

I-Introducción

Bachmann O y Blaich R. 1988. Isoelectric focusing of grapevine peroxidases as a tool for ampelography. *Vitis* 27: 147-155.

Banci L. 1997. Structural properties of peroxidases. *J Biotechnol* 53: 253-263.

Barceló AR y Pomar F. 2001. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. *Phytochemistry* 57: 1105-1113.

Baumgartner K, Coetzee MP y Hoffmeister D. 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Mol Plant Pathol* 12: 515-534.

Baumgartner K y Rizzo DM. 2006. Relative resistance of grapevine rootstocks to *Armillaria* root disease. *Am J Enol Vitic* 57: 408-414.

Bent A. 2006. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. En: Wang K (ed.). *Agrobacterium* Protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 343. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. pp. 87-103.

Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A y Plourde GL. 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol* 121: 135-146.

Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, Spagnolo A, Clément C y Fontaine F. 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathol* 62: 243-265.

Bhat SR y Srinivasan S. 2002. Molecular and genetic analyses of transgenic plants: considerations and approaches. *Plant Sci* 163: 673-681.

Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y y King J. 2009. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *J Exp Bot* 60: 509-521.

Bisson M, Houeix N, Hulot C, Lacroix G., Lefevre JP, Leveque S, Magaud H y Morin A. 2006. Arsenic et ses dérivés inorganiques. INERIS, fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.

Boerjan W, Ralph J y Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519-546.

Bohlmann H y Broekaert W. 1994. The role of thionins in plant protection. *CRC Crit Rev Plant Sci* 13: 1-16.

Bonfim K, Faria JC, Nogueira EO, Mendes EA y Aragão FJ. 2007. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant Microbe Interact* 20: 717-726.

Boudet AM, Lapierre C y Grima-Pettenati J. 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol* 129: 203-236.

Boudon-Padieu E y Maixner M. 2007. Potential effects of climate change on distribution and activity of insect vectors of grapevine pathogens. En: Proceedings of the international and multi-disciplinary colloquium "Global warming, which potential impacts on the vineyards?". Beaune, Francia. Marzo 28-30. pp. 1-8.

Broekaert W, Cammue B, Rees S y Vanderleyden J. 1999. Transgenic plants expressing biocidal proteins. United States Patent 5986176: 1-33.

Brogue K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ y Broglie R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Science 254: 1194-1197.

Brunow G, Kilpelainen I, Sipila J, Syrjanen K, Karhunen P, Setala H y Rummakko P. 1998. Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin. En: Lewis NG y Sarkene S (eds.). Lignin and lignan biosynthesis. American Chemical Society. Washington DC, USA. pp. 131-147.

Cabras P y Angioni A. 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. J Agric Food Chem 48: 967-973.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Cabitza F, Pala M y Farris GA. 2000. Fate of quinoxifen residues in grapes, wine, and their processing products. J Agric Food Chem 48: 6128-6131.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Farris GA, Madau G y Emonti G. 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. J Agric Food Chem 47: 3854-3857.

Calderón AA, García-Florenciano E, Muñoz R y Ros Barceló A. 1992. Gamay grapevine peroxidase: its role in vacuolar anthocyanin degradation. Vitis 31: 139-147.

Calhelha RC, Andrade JV, Ferreira IC y Estevinho LM. 2006. Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. Food Microbiol 23: 393-398.

Cao H, Li X y Dong X. 1998. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc Natl Acad Sci USA 95: 6531-6536.

Carballido X. 2017. O sector vitivinícola galego. Tempos novos: revista mensual de información e opinión para o debate 236: 28-31.

Cesar SA y Ignacimuthu S. 2012. Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes. Biotechnol Lett 34: 995-1002.

Česnik HB, Gregorčič A y Čuš F. 2008. Pesticide residues in grapes from vineyards included in integrated pest management in Slovenia. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 25: 438-443.

Chakraborty S, Tiedemann AV y Teng PS. 2000. Climate change: potential impact on plant diseases. Environ Pollut 108: 317-326.

I-Introducción

Chapeland F, Fritz R, Lanen C, Gredt M y Leroux P. 1999. Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). Pestic Biochem Physiol 64: 85-100.

Chiang HC, Lo JC y Yeh KC. 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. Environ Sci Technol 40: 6792-6798.

Chisholm ST, Coaker G, Day B y Staskawicz BJ. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124: 803-814.

Cobos Román R. 2008. Los decaimientos de la vid en Castilla y León: aislamiento, caracterización y métodos de control de las enfermedades de la madera de la vid (*Vitis vinifera*). Tesis doctoral. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.

Conner AJ, Barrell PJ, Baldwin SJ, Lokerse AS, Cooper PA, Erasmuson AK, Nap J y Jacobs JME. 2007. Intragenic vectors for gene transfer without foreign DNA. Euphytica 154: 341-353.

Conner A, Pringle J, Lokerse A, Jacobs J, Barrell P, Deroles S y Boase M. 2010. Plant transformation using DNA minicycles. WO patent application. WO 2010/09536 A2.

Converso DA y Fernández ME. 1996. Ca²⁺ activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control. Arch Biochem Biophys 333: 59-65.

Cosio C y Dunand C. 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. J Exp Bot 60: 391-408.

Costa MM, Hilliou F, Duarte P, Pereira LG, Almeida I, Leech M, Memelink J, Barceló AR y Sottomayor M. 2008. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. Plant Physiol 146: 403-417.

Dadami E, Moser M, Zwiebel M, Krczal G, Wassenegger M y Dalakouras A. 2013. An endogene-resembling transgene delays the onset of silencing and limits siRNA accumulation. FEBS Lett 587: 706-710.

Demont-Caulet N, Lapierre C, Jouanin L, Baumberger S y Méchin V. 2010. Arabidopsis peroxidase-catalyzed copolymerization of coniferyl and sinapyl alcohols: kinetics of an endwise process. Phytochemistry 71: 1673-1683.

Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D y Molina A. 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. Front Plant Sci 4: 155.

De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P y Visser R. 2003. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. Nat Biotechnol 21: 439-442.

Díaz-Riquelme J, Zhurov V, Rioja C, Pérez-Moreno I, Torres-Pérez R, Grimplet J, Carbonell-Bejerano P, Bajda S, Van Leeuwen T, Martínez-Zapater JM, Grbic M y Grbic V. 2016. Comparative genome-wide transcriptome analysis of *Vitis vinifera* responses to adapted and non-adapted strains of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. BMC Genomics 17: 74.

Di Genova A, Almeida AM, Muñoz-Espinoza C, Vizoso P, Travisany D, Moraga C, Pinto M, Hinrichsen P, Orellana A y Maass A. 2014. Whole genome comparison between table and wine grapes reveals a comprehensive catalog of structural variants. BMC Plant Biol 14: 7.

Du YP, Wang ZS y Zhai H. 2011. Grape root cell features related to phylloxera resistance and changes of anatomy and endogenous hormones during nodosity and tuberosity formation. Aust J Grape Wine Res 17: 291-297.

Duarte-Vázquez MA, García-Almendárez BE, Rojo-Domínguez A, Whitaker JR, Arroyave-Hernández C y Regalado C. 2003. Monosaccharide composition and properties of a deglycosylated turnip peroxidase isoenzyme. Phytochemistry 62: 5-11.

Duchêne É. 2016. How can grapevine genetics contribute to the adaptation to climate change? OENO One 50: 113-124.

Edwards SL, Raag R, Wariishi H, Gold MH y Poulos TL. 1993. Crystal structure of lignin peroxidase. Proc Natl Acad Sci USA 90: 750-754.

Elad Y. 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. Euro J Plant Pathol 102: 719-732.

Elad Y y Pertot I. 2014. Climate change impacts on plant pathogens and plant diseases. J Crop Improv 28: 99-139.

Elad Y, Zimand G, Zaqs Y, Zuriel S y Chet I. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathol 42: 324-332.

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

Elias D y Bernot MJ. 2014. Effects of atrazine, metolachlor, carbaryl and chlorothalonil on benthic microbes and their nutrient dynamics. PLoS One 9: e109190.

Erman JE y Vitello LB. 2002. Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. Biochim Biophys Acta 1597: 193-220.

Fisac Muños M. 2015. Galicia entre copas: un viaje fascinante por los mejores vinos del fin del mundo. Hércules de Ediciones. A Coruña, España.

Fossdal CG, Nagy NE, Hietala AM, Kvaalen H, Slimestad R, Woodward S y Solheim H. 2012. Indications of heightened constitutive or primed host response

I-Introducción

affecting the lignin pathway transcripts and phenolics in mature Norway spruce clones. *Tree Physiol* 32: 1137-1147.

Fourie PH y Halleen F. 2004. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Dis* 88: 1241-1245.

Fraser CM y Chapple C. 2011. The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* 9: e0152.

Fussler L, Kobes N, Bertrand F, Mauray M, Grosman J y Savary S. 2008. A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the National Grapevine Wood Diseases Survey. *Phytopathology* 98: 571-579.

Gadaleta A, Giancaspro A, Blechl AE y Blanco A. 2008. A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses *IDy10*. *J Cereal Sci* 48: 439-445.

Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT y Poulos TL. 1997. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct Biol* 4: 1032-1038.

Galet P. 1977. Le pourridié-agaric. En: Imprimerie du Paysan du midi (ed.). *Les maladies et les parasites de la vigne*. Montpellier, Francia. pp. 440-447.

García JH y Díaz-Fierros F. 2009. A viticultura. En: Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible (ed.). *Evidencias e impactos do cambio climático en Galicia*. Xunta de Galicia. pp. 131-138.

García-Florenciano E, Calderón AA, Pedreño MA, Muñoz R y Ros Barceló A. 1991. The vacuolar localization of basic isoperoxidases in grapevine suspension cell cultures and its significance in indole-3-acetic acid catabolism. *Plant Growth Regul* 10: 125-138.

García Novais F. 1999. Pragas e enfermidades comúns na vide de Galicia. *Xóvenes agricultores* 171: 46-49.

Gayoso C, Pomar F, Novo-Uzal E, Merino F y de Ilárduya OM. 2010. The *Ve*-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives *PAL* gene expression. *BMC Plant Biol* 10: 232.

Gray JS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP y Montgomery R. 1996. The glycans of soybean peroxidase. *Glycobiology* 6: 23-32.

Green BN y Oliver RWA. 1991. The study of intact proteins and glycoproteins by electrospray m.s. *Biochem Soc Trans* 19: 929-935.

Grimplet J, Van Hemert J, Carbonell-Bejerano P, Díaz-Riquelme J, Dickerson J, Fennell A, Pezzotti M y Martínez-Zapater JM. 2012. Comparative analysis of grapevine whole-genome gene predictions, functional annotation, categorization and integration of the predicted gene sequences. *BMC Res Notes* 5: 213.

Gurr SJ y Rushton PJ. 2005a. Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it? *Trends Biotechnol* 23: 283-290.

Gurr SJ y Rushton PJ. 2005b. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *Trends Biotechnol* 23: 275-282.

Hahn M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *J Chem Biol* 7: 133-141.

Hammond-Kosack KE y Parker JE. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* 14: 177-193.

Herche R. 2009. Control strategies for trunk diseases of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Tesis doctoral. Department of Plant Pathology. UC Davis.

Hernández Mañas JL. 2017. A estación de viticultura e enología: a aportación científica. *Tempos novos: revista mensual de información e opinión para o debate* 236: 32-35.

Higuchi T. 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol* 24: 23-63.

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

Hiraga S, Yamamoto K, Ito H, Sasaki K, Matsui H, Honma M, Nagamura Y, Sasaki T y Ohashi Y. 2000. Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Lett* 471: 245-250.

Holme IB, Dionisio G, Brinch-Pedersen H, Wendt T, Madsen CK, Vincze E y Holm PB. 2012. Cisgenic barley with improved phytase activity. *Plant Biotechnol J* 10: 237-247.

Holme IB, Wendt T y Holm PB. 2013. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol J* 11: 395-407.

Hoos G y Blaich R. 1988. Metabolism of stilbene phytoalexins in grapevines: oxidation of resveratrol in single-cell cultures. *Vitis* 27: 1-12.

Ibrahim AB y Aragão FJL. 2015. RNAi-mediated resistance to viruses in genetically engineered plants. En: Mysore K y Senthil-Kumar M (eds.). *Plant Gene Silencing. Methods in Molecular Biology*, vol. 1287. Humana Press. New York, USA. pp. 81-92.

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

Jaillon O, Aury JM, Noël B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguency P, Dasilva C, Horner

D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pe ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F y Wincker P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-467.

Jespersen HM, Kjaersgård IV, Østergaard L y Welinder KG. 1997. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem J* 326: 305-310.

Jess S, Kildea S, Moody A, Rennick G, Murchie AK y Cooke LR. 2014. European Union policy on pesticides: implications for agriculture in Ireland. *Pest Manag Sci* 70: 1646-1654.

Jones JDG. 2001. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr Opin Plant Biol* 4: 281-287.

Joshi SG, Schaart JG, Groenwold R, Jacobsen E, Schouten HJ y Krens FA. 2011. Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Mol Biol* 75: 579-591.

Kalunke RM, Tundo S, Benedetti M, Cervone F, De Lorenzo G y D'Ovidio R. 2015. An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. *Front Plant Sci* 6: 146.

Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Umemura K, Umezawa T y Shimamoto K. 2006 Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 230-235.

Kay R, Chan A, Daly M y McPherson J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.

Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R, Verrier JL, Roby D y Ricci P. 1999. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell* 11: 223-235.

Köhl J, Gerlagh M, De Haas BH y Krijger MC. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* in cyclamen with *Ulocladium atrum* and *Gliocladium roseum* under commercial growing conditions. *Phytopathology* 88: 568-575.

Lamichhane JR, Dachbrodt-Saaydeh S, Kudsk P y Messéan A. 2016. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. *Plant Dis* 100: 10-24.

Lardner R, Mahoney N, Zanker TP, Molyneux RJ y Scott ES. 2006. Secondary metabolite production by the fungal pathogen *Eutypa lata*: analysis of extracts from

grapevine cultures and detection of those metabolites *in planta*. Aust J Grape Wine Res 12: 107-114.

Larignon P, Darne G, Menard E, Desache F y Dubos B. 2008. Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne? Le Progrès Agricole et Viticole 125: 642-651.

Larignon P, Fontaine F, Farine S, Clément C y Bertsch C. 2009. Esca et black dead arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. C R Biol 332: 765-783.

Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A y Sinskey AJ. 2002. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. Metab Eng 4: 67-79.

Lewis NG y Yamamoto E. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 41: 455-496.

Li X, Weng JK y Chapple C. 2008. Improvement of biomass through lignin modification. Plant J 54: 569-581.

Liao XR, Zhu XC y He PC. 1999. A cationic peroxidase from leaves of *Vitis pseudoreticulata*. Phytochemistry 51: 143-145.

Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM y Dougherty WG. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. Plant Cell 5: 1749-1759.

Lionetti V, Giancaspro A, Fabri E, Giove SL, Reem N, Zobotina OA, Blanco A, Gadaleta A y Bellincampi D. 2015. Cell wall traits as potential resources to improve resistance of durum wheat against *Fusarium graminearum*. BMC Plant Biol 15: 6.

Luo Z y Chen Z. 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in *Arabidopsis*. Plant Cell 19: 943-958.

Malinovsky FG, Fangel JU y Willats WGT. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. Front Plant Sci 5: 178.

Manfredini C, Sicilia F, Ferrari S, Pontiggia D, Salvi G, Caprari C, Lorito M y De Lorenzo G. 2005. Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. Physiol Mol Plant Pathol 67: 108-115.

Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A y del Río JC. 2005. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Int Microbiol 8: 195-204.

Martínez Chantada H, Núñez Pérez M, Maceira Vidal XA, Leiro Lois A y Daporta Padín XR. 1999. A vide e o viño. A Nosa Terra. Vigo, España.

I-Introducción

Martínez Rodríguez MC, Boso Alonso S y Santiago Blanco JL. 2006. Importancia da selección clonal na variedade Albariño (*Vitis vinifera* L.). Boletín de Viticultura del Consello Regulador de la Denominación de Origen Rías Baixas 19: 4-5.

Martínez-Rodríguez AJ, Boso S, Santiago JL, Cebollero E, Alonso-Villaverde V, Juega M, Gago P, León A, Zubiaurre E, Núñez YP, González I, Oliveira A, Fonseca JM, Rodríguez E, Carrascosa AV y Martínez MC. 2009 Estudio para la mejora de la calidad del vino Albariño. Revista Real Academia Galega de Ciencias 28: 119-214.

Mathé C, Barre A, Jourda C y Dunand C. 2010. Evolution and expression of class III peroxidases. Arch Biochem Biophys 500: 58-65.

Mato MC, Rúa ML y Ferro E. 1988. Changes in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured *in vitro*. Physiol Plant 72: 84-88.

McEldoon JP y Dordick JS. 1996. Unusual thermal stability of soybean peroxidase. Biotechnol Prog 12: 555-558.

McElroy D, Zhang W, Cao J y Wu R. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. Plant Cell 2: 163-171.

McMannus MT y Ashford DA. 1997. Glycosylation of plant peroxidases. Plant Perox Newslett 10: 15-23.

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

Miao YC y Liu CJ. 2010. ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. Proc Natl Acad Sci USA 107: 22728-22733.

Miller AJ, Matasci N, Schwaninger H, Aradhya MK, Prins B, Zhong GY, Simon C, Buckler ES y Myles S. 2013. *Vitis* phylogenomics: hybridization intensities from a SNP array outperform genotype calls. PLoS One 8: e78680.

Milli A, Cecconi D, Bortesi L, Persi A, Rinalducci S, Zamboni A, Zoccatelli G, Lovato A, Zolla L y Polverari A. 2012. Proteomic analysis of the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*. J Proteomics 75: 1284-1302.

Mirkov TE. 2003. The molecular basis of genetic modification and improvement of crops. En: Chrispeels MJ y Sadava DE (eds.). Plants, genes, and crop biotechnology. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts, USA. pp. 124-151.

Moerschbacher BM, Noll U, Gorrichon L y Reisener HJ. 1990. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. Plant Physiol 93: 465-470.

- Moncousin CH, Favre JM y Gaspar T.** 1988. Changes in peroxidase activity and endogenous IAA levels during adventitious root formation in vine cuttings. En: Kutacek M, Bandurski RS y Krekule J (eds.). Physiology and biochemistry of auxins in plants. Academia. Prague, República Checa. pp. 331-337.
- Morales M, Alcántara J y Ros Barceló A.** 1997. Oxidation of *trans*-resveratrol by a hypodermal peroxidase isoenzyme from Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. Am J Enol Vitic 48: 33-38.
- Morales M, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A y Calderón AA.** 1993a. Oxidation of flavonols and flavonol glycosides by a hypodermal peroxidase isoenzyme from Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. J Sci Food Agric 62: 385-391.
- Morales M, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A y Calderón AA.** 1993b. Purification and kinetic characterization of a basic peroxidase isoenzyme responsible for lignifications in Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. Food Chem 48: 391-394.
- Morales M y Ros Barceló A.** 1997. A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. Phytochemistry 45: 229-232.
- Mugnai L, Graniti A y Surico G.** 1999. Esca (black measles) and brown wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines. Plant Dis 83: 404-418.
- Nagaya S, Kawamura K, Shinmyo A y Kato K.** 2010. The *HSP* terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. Plant Cell Physiol 51: 328-332.
- Nakano Y, Yamaguchi M, Endo H, Rejab NA y Ohtani M.** 2015. NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. Front Plant Sci 6: 288.
- Nicholson RL y Hammerschmidt R.** 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annu Rev Phytopathol 30: 369-389.
- Nicholson SJ y Srivastava V.** 2009. Transgene constructs lacking transcription termination signal induce efficient silencing of endogenous targets in *Arabidopsis*. Mol Genet Genomics 282: 319-328.
- Nose M, Bernards MA, Furlan M, Zajicek J, Eberhardt TL y Lewis NG.** 1995. Towards the specification of consecutive steps in macromolecular lignin assembly. Phytochemistry 39: 71-79.
- Novo-Uzal E, Fernández-Pérez F, Herrero J, Gutiérrez J, Gómez-Ros LV, Bernal MA, Díaz J, Cuello J, Pomar F y Pedreño MA.** 2013. From *Zinnia* to *Arabidopsis*: approaching the involvement of peroxidases in lignification. J Exp Bot 64: 3499-3518.
- Nowara D, Gay A, Lacomme C, Shaw J, Ridout C, Douchkov D, Hensel G, Kumlehn J y Schweizer P.** 2010. HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. Plant Cell 22: 3130-3141.

I-Introducción

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

Oerke EC. 2006. Crop losses to pests. *J Agric Sci* 144: 31-43.

Ortega JL, Moguel-Esponda S, Potenza C, Conklin CF, Quintana A y Sengupta-Gopalan C. 2006. The 3'untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS₁) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. *Plant J* 45: 832-846.

Padidam M. 2003. Chemically regulated gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol* 6: 169-177.

Pandey SP y Somssich IE. 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol* 150: 1648-1655.

Pandolfini T, Molesini B, Avesani L, Spena A y Polverari A. 2003. Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the *rolC* promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. *BMC Biotechnol* 3: 7.

Parrón T, Requena M, Hernández AF y Alarcón R. 2014. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicol Lett* 230: 157-165.

Passardi F, Cosio C, Penel C y Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* 24: 255-265.

Passardi F, Penel C y Dunand C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 9: 534-540.

Pearson RC y Goheen AC. 1988. Compendium of grape diseases. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA.

Pertot I, Gobbin D, De Luca F y Prodorutti D. 2008. Methods of assessing the incidence of *Armillaria* root rot across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial-temporal pattern in northern Italy. *Crop Prot* 27: 1061-1070.

Pesquet E, Zhang B, Gorzsás A, Puhakainen T, Serk H, Escamez S, Barbier O, Gerber L, Courtois-Moreau C, Alatalo E, Paulin L, Kangasjärvi J, Sundberg B, Goffner D y Tuominena H. 2013. Non-cell-autonomous postmortem lignification of tracheary elements in *Zinnia elegans*. *Plant Cell* 25: 1314-1328.

Piontek K, Smith AT y Blodig W. 2001. Lignin peroxidase structure and function. *Biochem Soc Trans* 29: 111-116.

Pomar F, Novo M, Bernal MA, Merino F y Ros Barceló A. 2004. Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytol* 163: 111-123.

Potenza C, Aleman L y Sengupta-Gopalan C. 2004. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 1-22.

Prodorutti D, De Luca F, Michelon L y Pertot I. 2009. Susceptibility to *Armillaria mellea* root rot in grapevine rootstocks commonly grafted onto Teroldego Rotaliano. *Phytopathol Mediterr* 48: 285-290.

Punja ZK y Zhang YY. 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J Nematol* 25: 526-540.

Rajeevkumar S, Anunanthini P y Sathishkumar R. 2015. Epigenetic silencing in transgenic plants. *Front Plant Sci* 6: 693.

Ralph J, Bunzel M, Marita JM, Hatfield RD, Lu F, Kim H, Schatz PF, Grabber JH y Steinhart H. 2004a. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem Rev* 3: 79-96.

Ralph J, Kim H, Lu F, Grabber JH, Leplé JC, Berrio-Sierra J, Derikvand MM, Jouanin L, Boerjan W y Lapierre C. 2008. Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperm lignins (and an indicator for cinnamoyl-CoA reductase deficiency). *Plant J* 53: 368-379.

Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH y Boerjan W. 2004b. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl propanoids. *Phytochem Rev* 3: 29-60.

Rasmussen MW, Roux M, Petersen M y Mundy J. 2012. MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Front Plant Sci* 3: 169.

Relyea RA. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159: 363-376.

Rommens CM. 2004. All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends Plant Sci* 9: 457-464.

Ros Barceló A. 1997. Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* 176: 87-132.

Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS y Pedreño MA. 2004. Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution? *Phytochem Rev* 3: 61-78.

Ros Barceló A, Zapata JM y Calderón AA. 1994. Oxidation of gallic acid to ellagic acid by the extracellular protein fraction from grapevine (*Vitis vinifera*) cell suspension cultures. *Viticulture and Enology Sciences* 49: 83-85.

Sánchez-Romero C, García-Gómez ML, Pliego-Alfaro F y Heredia A. 1994. Effect of partial deglycosylation on catalytic characteristics and stability of an avocado peroxidase. *Physiol Plant* 92: 97-101.

I-Introducción

Santos MT, Alonso MT, Ladero I y Martín MA. 2005. Plantas medicinales españolas. *Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera* (*Vitaceae*). *Studia bot* 24: 55-64.

Schaart JG, Krens FA, Pelgrom KT, Mendes O y Rouwendal GJ. 2004. Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnol J* 2: 233-240.

Schmidlin L, Poutaraud A, Claudel P, Mestre P, Prado E, Santos-Rosa M, Wiedemann-Merdinoglu S, Karst F, Merdinoglu D y Hugueney P. 2008. A stress-inducible resveratrol *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiol* 148: 1630-1639.

Schouten HJ, Krens FA y Jacobsen E. 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO Rep* 7: 750-753.

Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S y Schmidt R. 2004. Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* 16: 2561-2572.

Schuller DJ, Ban N, van Huystee RB, McPherson A y Poulos TL. 1996. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4: 311-321.

Schwab R, Ossowski S, Riestler M, Warthmann N y Weigel D. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1121-1133.

Sciancalepore V, Longone V y Alvitì FS. 1985. Partial purification and some properties of peroxidase from Malvasia grapes. *Am J Enol Vitic* 36: 105-110.

Segura A, Moreno M, Madueño F, Molina A y García-Olmedo F. 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 16-23.

Sharma RR, Singh D y Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol Control* 50: 205-221.

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y y Yoshimura K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53: 1305-1319.

Simon B y Sengupta-Gopalan C. 2010. The 3' untranslated region of the two cytosolic glutamine synthetase (GS₁) genes in alfalfa (*Medicago sativa*) regulates transcript stability in response to glutamine. *Planta* 232: 1151-1162.

Skulachev VP. 1998. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 423: 275-280.

Smith AH, Gill WM, Pinkard EA y Mohammed CL. 2007. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. *For Path* 37: 361-373.

Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG y Waterhouse PM. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320.

Smulevich G, Jakopitsch C, Droghetti E y Obinger C. 2006. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *J Inorg Biochem* 100: 568-585.

Sparkes IA, Runions J, Kearns A y Hawes C. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* 1: 2019-2025.

Spinosi J y Févotte J. 2009. Le programme Matphyto: matrices cultures-expositions aux produits phytosanitaires. Exemple de matrices cultures-expositions aux pesticides arsenicaux. Institut de veille sanitaire. Saint-Maurice, Francia. 6 p.

Strittmatter G, Janssens J, Opsomer C y Botterman J. 1995. Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Nat Biotechnol* 13: 1085-1089.

Styger G, Prior B y Bauer FF. 2011. Wine flavor and aroma. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38: 1145-1159.

Surico G, Mugnai L y Marchi G. 2006. Older and more recent observations on esca: a critical review. *Phytopathol Mediterr* 45: 68-86.

Tams JW y Welinder KG. 1995. Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Anal Biochem* 228: 48-55.

Telem RS, Wani SH, Singh NB, Nandini R, Sadhukhan R, Bhattacharya S y Mandal N. 2013. Cisgenics-A sustainable approach for crop improvement. *Curr Genomics* 14: 468-476.

Terral JF, Tabard E, Bouby L, Ivorra S, Pastor T, Figueiral I, Picq S, Chevance JB, Jung C, Fabre L, Tardy C, Compan M, Bacilieri R, Lacombe T y This P. 2010. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Ann Bot* 105: 443-455.

Thomma BP, Cammue BP y Thevissen K. 2002. Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.

Thomma BP, Nürnberger T y Joosten MH. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23: 4-15.

Tronsmo A y Ystaas J. 1980. Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. *Plant Dis* 64: 1009.

Tzin V y Galili G. 2010. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* 8: e0132.

I-Introducción

Úrbez-Torres JR, Peduto F, Smith RJ y Gubler WD. 2013. Phomopsis dieback: a grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Dis* 97: 1571-1579.

Vanblaere T, Szankowski I, Schaart J, Schouten H, Flachowsky H, Broggini GA y Gessler C. 2011. The development of a cisgenic apple plant. *J Biotechnol* 154: 304-311.

Vance CP, Kirk TK y Sherwood RT. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann Rev Phytopathol* 18: 259-288.

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J y Boerjan W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* 153: 895-905.

Van Loon LC, Rep M y Pieterse CM. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135-162.

Van Niekerk JM, Fourie PH, Halleen F y Crous PW. 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathol Mediterr* 45: 43-54.

Vaucheret H, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC y Vernhettes S. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16: 651-659.

Veitch NC. 2004a. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochem Rev* 3: 3-18.

Veitch NC. 2004b. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65: 249-259.

Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Demattè L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F y Viola R. 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* 2: e1326.

Venter M. 2007. Synthetic promoters: genetic control through *cis* engineering. *Trends Plant Sci* 12: 118-124.

Veronese P, Ruiz MT, Coca MA, Hernández-López A, Lee H, Ibeas JI, Damsz B, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA y Narasimhan ML. 2003. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiol* 131: 1580-1590.

Vidal JR, Gómez C, Cutanda MC, Shrestha BR, Bouquet A, Thomas MR y Torregrosa L. 2010. Use of gene transfer technology for functional studies in grapevine. *Aust J Grape Wine Res* 16: 138-151.

Vivier MA y Pretorius IS. 2002. Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends Biotechnol* 20: 472-478.

Wagschal I, Abou-Mansour E, Petit AN, Clément C y Fontaine F. 2008. Wood diseases of grapevine: a review on eutypa dieback and esca. En: Ait Barka E y Clément C (eds.). *Plant-Microbe Interactions. Research Signpost. Kerala, India.* pp. 367-391.

Wally O y Punja ZK. 2010a. Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants. *GM Crops* 1: 199-206.

Wally O y Punja ZK. 2010b. Enhanced disease resistance in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants over-expressing a rice cationic peroxidase. *Planta* 232: 1229-1239.

Wang Y, Chantreau M, Sibout R y Hawkins S. 2013. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Front Plant Sci* 4: 220.

Wang H, Moore MJ, Soltis PS, Bell CD, Brockington SF, Alexandre R, Davis CC, Latvis M, Manchester SR y Soltis DE. 2009. Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3853-3858.

Way HM, Birch RG y Manners JM. 2011. A comparison of individual and combined L-phenylalanine ammonia lyase and cationic peroxidase transgenes for engineering resistance in tobacco to necrotrophic pathogens. *Plant Biotechnol Rep* 5: 301-308.

Way HM, Kazan K, Goulter KC, Birch RG y Manners JM. 2000. Expression of the *Shpx2* peroxidase gene of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced resistance to *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae* and *Cercospora nicotianae*. *Mol Plant Pathol* 1: 223-232.

Weeks JT, Ye J y Rommens CM. 2008. Development of an *in planta* method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Res* 17: 587-597.

Welinder KG. 1992a. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.

Welinder KG. 1992b. Plant peroxidases: structure-function relationships. En: Penel C, Gaspar T y Greppin H (eds.). *Plant Peroxidases 1980-1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects.* University of Geneva. Geneva, Suiza. pp. 1-24.

Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgård IV, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM y Duroux L. 2002 Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 269: 6063-6081.

West JS y Fox RTV. 2002. Stimulation of *Armillaria mellea* by phenolic fungicides. *Ann Appl Biol* 140: 291-295.

I-Introducción

Wilson IB. 2002. Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Curr Opin Struct Biol* 12: 569-577.

Xu L, Zhu L, Tu L, Liu L, Yuan D, Jin L, Long L y Zhang X. 2011. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *J Exp Bot* 62: 5607-5621.

Yang BY, Gray JS y Montgomery R. 1996. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydr Res* 287: 203-212.

Yang L, Wakasa Y, Kawakatsu T y Takaiwa F. 2009. The 3'-untranslated region of rice glutelin *GluB-1* affects accumulation of heterologous protein in transgenic rice. *Biotechnol Lett* 31: 1625-1631.

Yoshida K y Shinmyo A. 2000. Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. *J Biosci Bioeng* 90: 353-362.

Zapata JM, Calderón AA, Muñoz R y Ros Barceló A. 1992. Oxidation of natural hydroxybenzoic acids by grapevine peroxidases: kinetic characteristics and substrate specificity. *Am J Enol Vitic* 43: 134-138.

Zhao Q y Dixon RA. 2011. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends Plant Sci* 16: 227-233.

Zhao Q, Nakashima J, Chen F, Yin Y, Fu C, Yun J, Shao H, Wang X, Wang ZY y Dixon RA. 2013. *LACCASE* is necessary and nonredundant with *PEROXIDASE* for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 3976-3987.

Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G y Boller T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428: 764-767.

Zrachya A, Kumar PP, Ramakrishnan U, Levy Y, Loyter A, Arazi T, Lapidot M y Gafni Y. 2007. Production of siRNA targeted against TYLCV coat protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus. *Transgenic Res* 16: 385-398.

C₁ ~ Capítulo 1

C₁ 1. Introducción

En los últimos años se ha experimentado un gran avance en lo que a técnicas de cultivo *in vitro* y técnicas de introducción de secuencias de ADN se refiere, abriendo un amplio abanico de nuevas posibilidades en la modificación de las especies vegetales.

Esto ha permitido la obtención de líneas transgénicas con nuevas características de interés, que van desde un aumento en el valor nutricional del cultivo (**McGloughlin, 2010**), hasta una mayor resistencia a patógenos (**Gurr y Rushton, 2005**).

Sin embargo, para poder sacar el mayor partido a estas nuevas herramientas, se requiere también el avance en el diseño de las construcciones de ADN que serán introducidas en la planta receptora. En este apartado cobra gran importancia la caracterización de nuevas secuencias reguladoras (promotores y terminadores), que permitan obtener los niveles y patrón de expresión del transgén deseados.

Uno de los logros asociados a los avances en biotecnología es la posibilidad de introducir de forma estable varios genes en la misma planta, lo que permite modificar rasgos complejos determinados por múltiples genes o la introducción de rutas metabólicas completas. Para esto es necesario el empleo de diferentes secuencias reguladoras (promotor/terminador) en los distintos *cassettes* de expresión génica, a fin de evitar posibles fenómenos de silenciamiento del transgén, que pueden ser desencadenados por homología de las secuencias reguladoras (**Matsushita, 2011; Xing et al., 2010; Bhullar et al., 2003**). De este modo, la disponibilidad de una mayor variedad de secuencias promotoras y terminadoras caracterizadas podría facilitar la introducción de múltiples transgenes en las células vegetales.

Los avances en biotecnología también abrieron las puertas a nuevas estrategias como la intragénesis y la cisgénesis (tratadas en detalle en el apartado I 2.3.1 de la Introducción), que cuentan con una mayor aceptación por parte de la población en comparación con la transgénesis. Estas estrategias están basadas en el uso exclusivo de secuencias del *pool* genético sexualmente compatible de la planta receptora, es decir, el mismo *pool* genético disponible para la mejora tradicional (**Holme et al., 2013**). Por tanto, el desarrollo de plantas intragénicas/cisgénicas requiere de la identificación de promotores y terminadores de cultivos importantes desde un punto de vista agronómico, o de especies íntimamente relacionadas capaces de hibridación sexual.

Además de la posibilidad de contribuir al desarrollo de las estrategias de intragénesis y cisgénesis, la caracterización de nuevas secuencias de origen vegetal ofrece una buena

alternativa a las clásicas secuencias de origen viral y bacteriano. El empleo de estas últimas se ha vinculado en varias ocasiones a fenómenos de silenciamiento del transgén (Vaucheret *et al.*, 1998; Elmayan y Vaucheret, 1996), que pueden conllevar desde unos bajos niveles de expresión del transgén, hasta la inestabilidad en sus niveles de expresión a través de las generaciones, problemas que se solventan con el empleo de secuencias vegetales (Hirai *et al.*, 2011; Garabagi *et al.*, 2012).

La mayoría de los promotores y terminadores empleados en la producción de vides (*Vitis vinifera* L.) transgénicas son de origen viral o bacteriano, a pesar de que hoy en día se dispone de secuencias completas del genoma de esta especie (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007; Di Genova *et al.*, 2014), de la anotación de los genes (Grimplet *et al.*, 2012) y de múltiples datos de transcriptómica, proteómica y metabolómica (Díaz-Riquelme *et al.*, 2016; Agudelo-Romero *et al.*, 2015; Milli *et al.*, 2012), lo que haría posible, y de forma sencilla, la identificación y aislamiento de secuencias reguladoras nativas.

Revisando la literatura se puede apreciar que no existen apenas trabajos en los que se caractericen secuencias reguladoras nativas de vid. Ciñéndose a secuencias reguladoras de genes con expresión constitutiva, el único trabajo que se puede mencionar es el de Li *et al.* (2012), en el que caracterizan los promotores de 7 genes de ubiquitina. En cuanto a la caracterización de terminadores de genes de vid con expresión constitutiva, no se ha encontrado constancia de que exista trabajo alguno. Esta baja disponibilidad de secuencias reguladoras nativas caracterizadas podría obstaculizar el avance de la biotecnología de la vid, a pesar de los grandes logros alcanzados en el cultivo *in vitro* y la transformación genética de esta especie. Surge de este modo la necesidad de caracterizar nuevos promotores y terminadores de vid, para poder adoptar las nuevas estrategias y tecnologías que van surgiendo con el tiempo, y así obtener líneas de vid genéticamente modificadas con unas características cada vez más mejoradas.

De entre todos los tipos de promotores, los constitutivos cuentan con una especial importancia, debido a su empleo en numerosas estrategias. Por una parte, permiten la obtención de plantas transgénicas que producen a altos niveles y en prácticamente todos sus tejidos proteínas de interés, actuando como una especie de biofactorías (Giddings *et al.*, 2000). Además, la alta expresión de un transgén en la totalidad de la planta es de gran utilidad para la caracterización funcional de nuevos genes, debido a que los efectos asociados son más pronunciados. Por último, los promotores constitutivos también son útiles en algunas estrategias de pérdida de función, como la de silenciamiento génico

mediante ARNi (ARN interferente) (Jelly *et al.*, 2014; Hernández-García y Finer, 2014).

Una buena fuente para la búsqueda de estas secuencias son los genes *housekeeping* de alta expresión, que codifican proteínas muy abundantes necesarias para las funciones básicas en las células vegetales, como en el caso del trabajo de Li *et al.* (2012) en el que caracterizan promotores de genes de ubiquitina. Otros posibles candidatos son los genes que codifican para componentes del citoesqueleto, como pueden ser las tubulinas y las actinas.

Estas últimas son unas de las proteínas más abundantes en las células eucariotas, constituyendo un componente estructural fundamental del citoesqueleto y dirigiendo la organización espacial de muchos procesos subcelulares. En las células vegetales, las actinas son cruciales para procesos tan importantes como el establecimiento y mantenimiento de la forma y polaridad celular, el movimiento de orgánulos, la división y expansión celular, el crecimiento apical y los flujos citoplasmáticos (Hussey *et al.*, 2006; Smith y Oppenheimer, 2005; Staiger, 2000).

Por este motivo, desde hace años, los promotores de genes de actinas han sido ampliamente estudiados, para evaluar su posible uso en transformación genética como promotores constitutivos de alta expresión. Algunos de los ejemplos que recoge la literatura, y en los que se ha demostrado el gran potencial de estas secuencias, son los de los promotores de los genes de la actina 1 (McElroy *et al.*, 1990b) y de la actina 2 (He *et al.*, 2009) de arroz (*Oryza sativa* L.) y el del gen de la actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Yang *et al.*, 2003; Dhankher *et al.*, 2002; An *et al.*, 1996).

En este trabajo se ha seleccionado el gen de la actina 7 de vid para aislar la secuencia de su promotor y su terminador, y evaluar su comportamiento para controlar la expresión del gen *uidA* de *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani y Chalmers, 1919 en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) transgénicas. Todo ello, con la finalidad de encontrar unas secuencias reguladoras de vid capaces de conducir la expresión constitutiva de los transgenes a altos niveles y de forma estable. Esto contribuiría a incrementar el *pool* de secuencias reguladoras de origen vegetal disponibles para la generación de plantas transgénicas, y facilitaría estrategias como la intragénesis para la mejora de la vid.

C₁ 2. Objetivos

Selección de un gen de actina de *Vitis vinifera* que se exprese de forma constitutiva y a altos niveles, características que convierten a su promotor y terminador en secuencias reguladoras con potencial interés para la expresión de transgenes.

Aislamiento del promotor y del terminador del gen seleccionado.

Valoración de la idoneidad de las secuencias aisladas para su empleo en la expresión de transgenes, atendiendo a su capacidad para dirigir la expresión constitutiva del gen reportero *uidA*, a altos niveles y de forma estable, en plantas de *Nicotiana tabacum* transgénicas.

C₁ 3. Materiales y métodos

C₁ 3.1. Construcción del árbol de distancias de los genes de actinas de *Arabidopsis thaliana* y de vid

El primer paso fue el alineamiento de las secuencias de los genes de actinas de *A. thaliana* y de vid, que se llevó a cabo mediante el método de ClustalW utilizando el programa informático MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

Las secuencias de los genes de *Arabidopsis thaliana* empleadas en el alineamiento se tomaron del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y son las identificadas como: gen de la actina 1 (GenBank: U39449.1), gen de la actina 2 (GenBank: U41998.1), gen de la actina 3 (GenBank: U39480.1), gen de la actina 4 (GenBank: U27980.1), gen de la actina 7 (GenBank: U27811.1), gen de la actina 8 (GenBank: U42007.1), gen de la actina 11 (GenBank: U27981.1), gen de la actina 12 (GenBank: U27982.1).

Las secuencias de los genes de actinas de vid se tomaron de la base de datos del genoma de la vid del CRIBI Biotechnology Center (Universidad de Padua) (Vitulo *et al.*, 2014) (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>), y sus códigos son los siguientes: VIT_04s0044g00580, VIT_06s0004g04570, VIT_08s0007g06520, VIT_11s0016g00770, VIT_12s0178g00200, VIT_13s0019g01240.

Una vez realizado el alineamiento, y empleando también el programa informático MEGA7, se construyó el árbol de distancias asociado mediante el método de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987).

C₁ 3.2. Construcción de una colección de plásmidos con el gen reportero *uidA* bajo el control de diferentes combinaciones de promotor/terminador

Todos los plásmidos obtenidos en este apartado se construyeron a partir de las colecciones pJit y pGreenII (Hellens *et al.*, 2000a; Hellens *et al.*, 2000b) (Figura C₁ 1), adquiridas al John Innes Centre (Norwich, Reino Unido). Estas colecciones comprenden una serie de plásmidos con sitios de multiclonaje, algunos dirigidos a la clonación de genes (por ejemplo los plásmidos pJit) y otros a la transformación de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend 1907) Conn 1942

(como por ejemplo los plásmidos pGreenII). Además, la colección pGreenII posee una variada gama de *cassettes* de expresión con diferentes combinaciones de promotores, terminadores, genes de selección y genes reporteros (<http://www.pgreen.ac.uk/>).

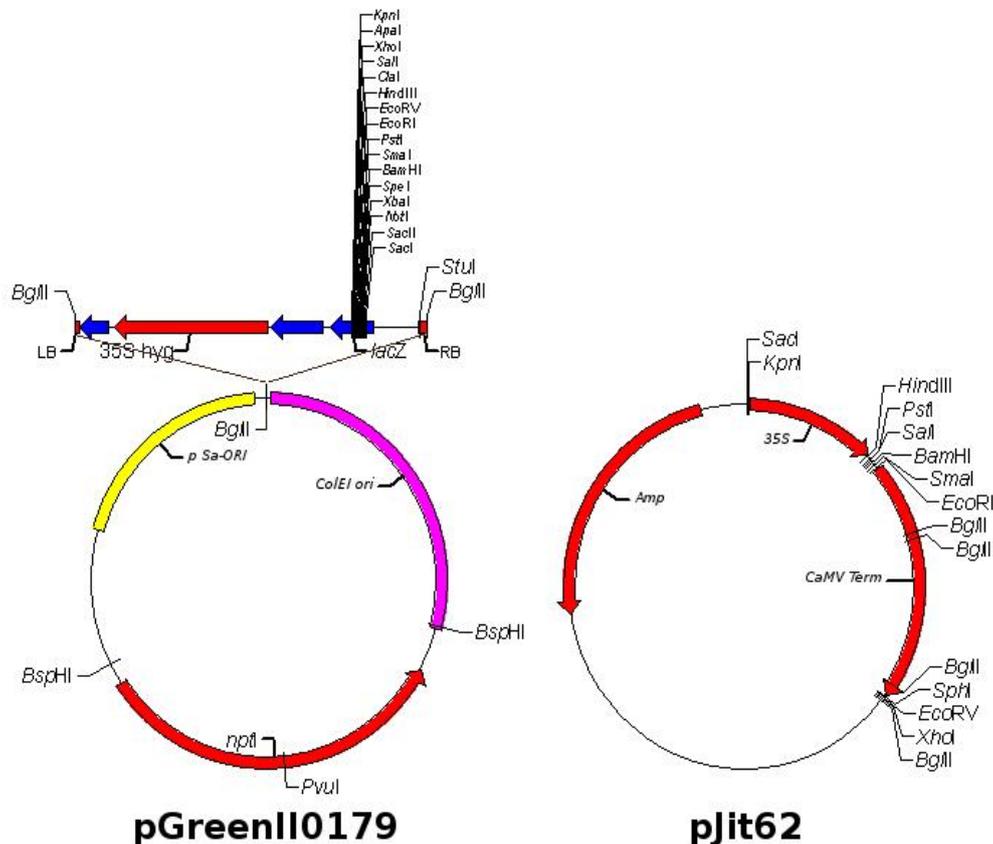


Figura C₁ 1.- Esquema de los vectores que se utilizaron para la construcción de la colección de plásmidos. Imágenes tomadas de la web <http://www.pgreen.ac.uk/>.

Los plásmidos empleados en este trabajo se obtuvieron mediante la inserción de diferentes *cassettes* de expresión (**Figura C₁ 2**), que consistían en el gen reportero *uidA* de *Escherichia coli* bajo el control de diferentes combinaciones de promotor y terminador, en el sitio de multiclonaje del pGreenII0179.

Para ello, en un primer paso, se introdujo el gen *uidA* en el sitio de multiclonaje del plásmido pJit62, resultando el plásmido al que se denominó pJit62(*uidA*). En este vector el gen reportero está flanqueado por el promotor CaMV35S y el terminador CaMV, y el conjunto de estas tres secuencias constituye el *cassette* P35S/TCaMV. Mediante enzimas de restricción este *cassette* fue escindido del pJit62(*uidA*) e insertado en el pGreenII0179, obteniéndose el primer plásmido de nuestra colección. Los *cassettes* PVviACT7/TVviACT7, PVviACT7/TCaMV y P35S/TVviACT7 se obtuvieron reemplazando en el pJit62(*uidA*) las correspondientes secuencias reguladoras de origen

viral por las secuencias reguladoras de vid aisladas. Una vez contruidos los *cassettes*, pudieron ser escindidos e incorporados en el pGreenII0179.

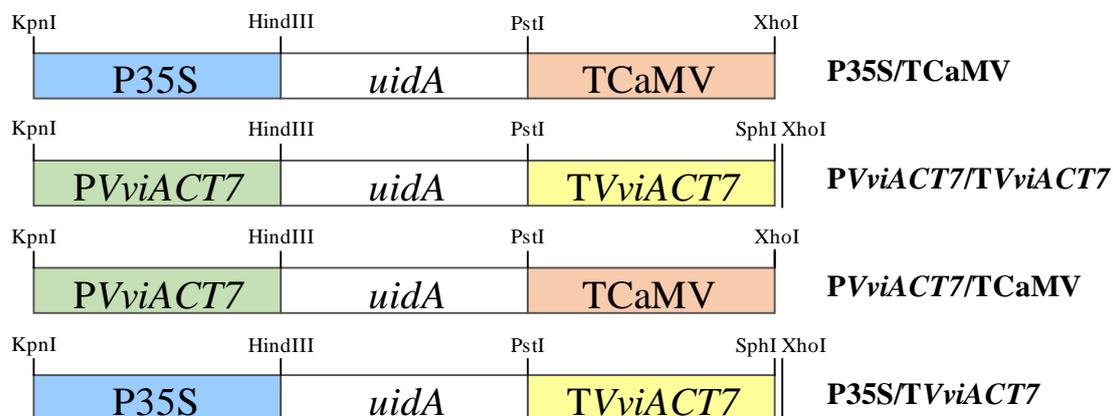


Figura C₁ 2.- Representación esquemática de los *cassettes* de expresión introducidos en los plásmidos pGreenII0179. A la derecha de cada construcción se indica el nombre con el que es designada en el texto. Además, en el esquema se incluyen las enzimas de restricción empleadas en la construcción de los *cassettes* y en su escisión/inserción en los plásmidos.

P35S: promotor CaMV35S (promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor) *uidA*: gen de la β -glucuronidasa de *Escherichia coli* TCaMV: terminador CaMV (terminador del virus del mosaico de la coliflor) PVviACT7: promotor del gen de la actina 7 de vid TVviACT7: terminador del gen de la actina 7 de vid

C₁ 3.2.1 Construcción del plásmido pJit62(*uidA*)

En primer lugar se aisló, mediante PCR y a partir de uno de los *cassettes* de la colección pGreenII (*cassette* 35S-GUS), la secuencia del gen reportero *uidA* de *Escherichia coli*. Los cebadores empleados se diseñaron manualmente, teniendo en cuenta la secuencia del gen recogida en el NCBI (GenBank: S69414.1). La secuencia de cada uno de estos cebadores, indicada a continuación, incluía además la diana de una enzima de restricción. *Las bases marcadas en negrita en las secuencias de los cebadores corresponden a dianas de enzimas de restricción.*

5'-GAGAAAGCTTATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA-3' HindIII

5'-GAGACTGCAGTCATTGTTTGCCTCCCTGCT-3' PstI

La PCR se realizó empleando la Pfu ADN Polimerasa (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las condiciones recogidas en la **Tabla C₁ 1**. La forma comercial del *cassette* 35S-GUS (liofilizada) se resuspendió en 10 μ l de agua MilliQ y como molde para la PCR se empleó 1 μ l de una dilución 1:100 (en agua MilliQ) de este *cassette* resuspendido.

C₁-Capítulo 1

El producto resultante de la PCR se purificó mediante el kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) y se digirió con las enzimas de restricción HindIII y PstI FastDigest (Thermo Fisher Scientific). *Todos los pasos realizados con kits a lo largo de este trabajo, así como las digestiones mediante enzimas de restricción, se realizaron siguiendo las especificaciones de la casa comercial, excepto que en el texto se indiquen otras condiciones. Además, las enzimas de restricción empleadas fueron siempre las FastDigest (Thermo Fisher Scientific).*

Con las mismas enzimas se digirió también el plásmido pJit62. Este plásmido, ahora linearizado, y la secuencia del gen *uidA*, con sus extremos digeridos, se purificaron con el kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) y se unieron mediante una reacción de ligación empleando la T4 ADN Ligasa (Roche). La cantidad de vector se fijó en 100 ng y el *ratio* molar del vector y el inserto fue de 1:1. La reacción se llevó a cabo según el protocolo proporcionado por la casa comercial, empleando 2 U de enzima, durante toda la noche a 4 °C. *Todas las ligaciones mencionadas en el apartado C₁ 3.2. se realizaron de este modo.*

Tabla C₁ 1. Condiciones de las PCR destinadas a la clonación del gen *uidA* y del promotor y el terminador del gen de la actina 7 de *vid* (PV*viACT7* y TV*viACT7*, respectivamente).

Mezcla de PCR		Programa de PCR	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Tampón Pfu 10X con MgSO ₄	2,5 µl	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	Desnaturalización	95	30 s	25
Cebador <i>forward</i> *	0,4 µM cf	<i>Annealing</i>	Tm-5	30 s	
Cebador <i>reverse</i> *	0,4 µM cf	Extensión	72	4 min	
ADN molde	**	Extensión final	72	10 min	1
Pfu ADN Polimerasa	1,875 U				
Agua MilliQ	Hasta 25 µl				
Volumen total	25 µl				

cf: concentración final Tm: temperatura de *melting* de los cebadores

* Los cebadores empleados en cada clonación fueron los indicados en el texto

** El ADN que se empleó como molde, para cada clonación, fue el indicado en el texto

El producto de la ligación fue empleado para transformar células de *E. coli*, tal y como se detalla en el apartado A 1. de los Anexos. Las bacterias que incorporaron el plásmido fueron cultivadas en medio LB (Luria-Bertani) (10 g/l tripton, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l cloruro de sodio) con 100 mg/l de carbenicilina, durante toda la noche, a 37 °C y en agitación, para, a partir de este cultivo, extraer dicho plásmido mediante el kit QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

El plásmido obtenido, pJit62(*uidA*), que porta el gen *uidA* controlado por el promotor CaMV35S y el terminador CaMV, constituyó el punto de partida para la construcción de los vectores basados en el pGreenII0179.

C₁ 3.2.2 Construcción de los plásmidos basados en el pGreenII0179

pGreenII0179 con cassette P35S/TCaMV

Para la construcción de este vector se digirieron los plásmidos pJit62(*uidA*) y pGreenII0179 con los enzimas KpnI y XhoI. El pGreenII0179 linearizado se purificó utilizando el kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Mientras que los productos de la digestión del pJit62(*uidA*) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y se recortó la banda cuyo tamaño coincidía con el del *cassette* P35S/TCaMV, que finalmente se purificó utilizando el mismo kit.

Los fragmentos purificados se ligaron y el producto de la ligación fue empleado para transformar *E. coli* (apartado A 1. de los Anexos). Las bacterias transformadas se cultivaron en medio LB con 50 mg/l de kanamicina, para a partir de ellas extraer el plásmido resultado de la ligación. El cultivo de las bacterias y extracción del plásmido se llevó a cabo del mismo modo que se ha detallado anteriormente en el apartado C₁ 3.2.1.

El plásmido obtenido comprende el pGreenII0179 con el *cassette* de expresión P35S/TCaMV insertado en el sitio de multiclonaje.

pGreenII0179 con cassette PVviACT7/TVviACT7, PVviACT7/TCaMV y P35S/TVviACT7

El ADN de vid, necesario para aislar las secuencias del promotor y del terminador del gen de la actina 7 (nombrados como PVviACT7 y TVviACT7, respectivamente) fue extraído a partir de hojas de plantas *in vitro* de *Vitis vinifera* L. var. Albariño. Estas plantas se cultivaron en medio CP10 (2,2 g/l medio Chée y Pool (**Chée y Pool, 1987**) (Duchefa Biochemie), 10 g/l sacarosa, 5,6 g/l Plant Agar (Duchefa Biochemie), 1 g/l carbón activo) (pH=5,95) en unas condiciones de 16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 20 °C. La extracción de su ADN genómico se realizó mediante el kit DNeasy[®] Plant Mini Kit de QIAGEN.

Este ADN sirvió como molde para aislar, mediante PCR, a PVviACT7 y TVviACT7. Para ello, se diseñaron cebadores teniendo en cuenta la secuencia del gen de la actina 7 de vid (VIT_04s0044g00580) y secuencias circundantes, recogidas en la base de datos

C₁~Capítulo 1

del genoma de la vid del CRIBI Biotechnology Center. La secuencia de dichos cebadores se indica a continuación.

PVviACT7

5'-GAGAGGTACCTGGCTGAGCCGAGCGGAGTTAT-3' KpnI

5'-GAGAAAGCTTCCTTTTATTACCTGCATGAGAAATATGAAGTCAGGGG-3' HindIII

TVviACT7

5'-GAGACTGCAGAATACAAGTGCTTTGATGGTGAG-3' PstI

5'-GAGAGCATGCCGGTTTACGGTTTTTACAATGCTTTAACA-3' SphI

Para la PCR se empleó la Pfu ADN Polimerasa (Thermo Fisher Scientific), y las condiciones seguidas fueron las indicadas en la **Tabla C₁ 1**. Como molde para la PCR se emplearon 200 ng del ADN genómico de las plantas *in vitro* de Albariño.

Para generar los plásmidos con secuencias reguladoras de vid se partió del pJit62(*uidA*). En el caso del pGreenII0179 con *cassette* PVviACT7/TVviACT7, primero se retiraron del pJit62(*uidA*), mediante enzimas de restricción, el promotor CaMV35S y el terminador CaMV, que acompañaban al gen *uidA*. Para introducir en su lugar, mediante ligación, a PVviACT7 y TVviACT7. Las enzimas empleadas fueron KpnI y HindIII, en el caso del promotor, y PstI y SphI en el del terminador.

En el caso del pGreenII0179 con el *cassette* PVviACT7/TCaMV simplemente se sustituyó el promotor CaMV35S del pJit62(*uidA*) por PVviACT7. Para obtener el pGreenII0179 con el *cassette* P35S/TVviACT7, se sustituyó el terminador CaMV del pJit62(*uidA*) por TVviACT7.

Una vez realizadas estas modificaciones sobre el pJit62(*uidA*), obteniéndose los *cassettes* deseados (PVviACT7/TVviACT7, PVviACT7/TCaMV y P35S/TVviACT7), los pasos siguientes hasta la obtención de los plásmidos definitivos, consistentes en el pGreenII0179 con dichas construcciones, fueron los mismos que en el caso del pGreenII0179 con *cassette* P35S/TCaMV.

C₁ 3.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez obtenidos los cuatro plásmidos de interés se transformó con ellos *Agrobacterium tumefaciens* (cepa EHA105).

Dado que todos los plásmidos empleados son derivados del pGreenII0179, se realizó una co-transformación de cada uno de ellos junto con el vector pSoup. *El plásmido pSoup es imprescindible para la replicación de los plásmidos pGreenII en Agrobacterium.*

La transformación de *Agrobacterium* se realizó por electroporación de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado A 2. de los Anexos.

C₁ 3.4. Obtención de plantas de tabaco transgénicas

C₁ 3.4.1 Transformación de tabaco mediante *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación estable de *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana se llevó a cabo mediante transformación de discos foliares, siguiendo el protocolo de **Clemente (2006)**, con ligeras modificaciones. Los discos foliares empleados en la transformación genética se tomaron de plantas *in vitro* de *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana de 1 mes de edad, crecidas desde semillas. Primero se esterilizaron las semillas de tabaco, mediante su inmersión en una solución de lejía comercial al 5 % con unas gotas de Tween-20, y luego se sembraron en recipientes MagentaTM (Sigma-Aldrich) con medio 0,5X MS (Murashige y Skoog) (**Murashige y Skoog, 1962**) con 10 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar (pH=5,8). Las condiciones de cultivo fueron de 16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 20 °C.

Dos días antes de la transformación, se inició un cultivo de *Agrobacterium* en 4 ml de medio YEP (*yeast extract peptone*) (10 g/l peptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl) (pH=7,0) con 50 mg/l de kanamicina, 25 mg/l rifampicina y 7,5 mg/l tetraciclina, que se mantuvo en agitación y a 28 °C durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se tomaron 2 ml de este cultivo y se añadieron a 20 ml de medio YEP suplementado con los antibióticos mencionados. Las bacterias se cultivaron a 28 °C y en agitación hasta el momento de la transformación.

El día anterior a la transformación, se cortaron discos foliares de las plantas de tabaco cultivadas *in vitro*. Los discos se pusieron sobre medio de precultivo (1X macro y micro elementos MS, 1X vitaminas MS, 30 g/l sacarosa, 8 g/l agar, 0,1 mg/l NAA (ácido naftalenacético), 1 mg/l BAP (benzilaminopurina) (pH=5,7)) y se mantuvieron bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 20 °C.

C₁~Capítulo 1

El día de la transformación, se centrifugó el cultivo de *Agrobacterium* a 3500g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de bacterias en el volumen de medio de cocultivo líquido (0,1X macro y micro elementos MS, 1X vitaminas MS, 30 g/l sacarosa, 0,1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 100 µM acetosiringona (3',5'-Dimetoxi-4'-hidroxiacetofenona), 3,7 g/l MES (ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico) (pH=5,4)) necesario para obtener una OD₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm) de 0,5-1. Tras transferir la suspensión bacteriana a una placa Petri, se sumergieron en ella los discos foliares, y se mantuvieron en contacto con la suspensión de bacterias durante 30 minutos.

Pasado ese tiempo, los discos foliares se depositaron sobre papel de filtro Whatman[®], que a su vez estaba colocado sobre medio de cocultivo sólido (0,1X macro y micro elementos MS, 1X vitaminas MS, 30 g/l sacarosa, 8 g/l agar, 0,1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 100 µM acetosiringona, 3,7 g/l MES (pH=5,4)), y se mantuvieron durante 3 días bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 20 °C.

A continuación, fueron transferidos a medio de regeneración (1X macro y micro elementos MS, 1X vitaminas MS, 30 g/l sacarosa, 8 g/l agar, 0,1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 25 mg/l higromicina, 200 mg/l cefotaxima (pH=5,7)), que era renovado cada 15 días. En el momento en que se formaron pequeños tallos con hojas, se seccionaron los tallos con un bisturí para transferirlos a medio de enraizamiento (0,5X macro y micro elementos MS, 1X vitaminas MS, 10 g/l sacarosa, 8 g/l agar, 0,1 mg/l NAA, 25 mg/l higromicina, 200 mg/l cefotaxima (pH=5,7)), que era renovado cada 2 semanas hasta que los tallos desarrollaron raíces. Las condiciones de cultivo durante la fase de regeneración y la de enraizamiento fueron de 16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 20 °C.

Una vez que se obtuvieron plantas completas, estas fueron transferidas a tierra y crecidas bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C.

C₁ 3.4.2 Selección de las plantas transformadas y obtención de líneas transgénicas homocigotas

Con el fin de conocer cuáles de las plantas regeneradas portaban el gen de interés se realizó un *screening* de estas mediante PCR, siguiendo el protocolo de **Kasajima et al. (2004)** con ciertas modificaciones.

Para ello se cortó una pequeña pieza de hoja de cada planta a analizar y se depositó en un tubo, en el que se añadieron 200 µl de una dilución 1:10 de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl (pH=7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y 0,5 % SDS (sodio dodecilsulfato)) en tampón TE (Tris-EDTA) (10 mM Tris-HCl (pH=8,0) y 1 mM EDTA). El tejido se homogeneizó levemente con un pistilo de plástico y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó en una centrífuga de sobremesa a máxima velocidad durante 5 minutos y se tomaron 0,6 µl del sobrenadante, que se añadieron a la mezcla de reacción de PCR. El volumen total de cada reacción de PCR era de 25 µl.

La PCR se llevó a cabo utilizando la DreamTaqTM ADN Polimerasa (Thermo Fisher Scientific), bajo las condiciones detalladas en la **Tabla C₁ 2**, y los cebadores empleados fueron los utilizados en la clonación del gen *uidA* (apartado C₁ 3.2.1).

Tabla C₁ 2. Condiciones para la realización de la PCR en la selección de las plantas transformadas.

Mezcla de PCR		Programa de PCR			
Tampón 10X DreamTaq	2,5 µl	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos	
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Cebador <i>forward</i>	0,4 µM cf	Desnaturalización	95	30 s	
Cebador <i>reverse</i>	0,4 µM cf	<i>Annealing</i>	59	30 s	35
ADN molde	0,6 µl	Extensión	72	2 min 30 s	
DreamTaq ADN Polimerasa	1,25 U	Extensión final	72	10 min	1
Agua MilliQ	Hasta 25 µl				
Volumen total	25 µl				

cf: concentración final

Cada una de las plantas que resultaron positivas en el *screening*, portando el gen de interés (*uidA*), constituyó una planta parental (T₀), y fueron el punto de inicio para la obtención (procedimiento detallado en el apartado A 3. de los Anexos) de líneas transgénicas de la T₂ homocigotas independientes (aquellas que provienen de diferente planta T₀).

Las plantas empleadas para todos los análisis detallados en este Capítulo 1 pertenecen a estas líneas transgénicas homocigotas independientes de la T₂.

C₁ 3.5. Análisis de los niveles de expresión del gen *uidA* en plantas de tabaco transgénicas

El análisis de los niveles de expresión del gen *uidA*, bajo el control de las diferentes combinaciones de secuencias reguladoras, se llevó a cabo en plantas de tres líneas de tabaco transgénicas para cada construcción (P35S/TCaMV, PV*viACT7*/TV*viACT7*, PV*viACT7*/TCaMV y P35S/TV*viACT7*).

Estas plantas fueron crecidas en tierra desde semillas hasta alcanzar los 2 meses de edad, encontrándose todas en el mismo estado de desarrollo cuando fueron analizadas, plantas adultas en el momento del inicio de la floración. Las condiciones de cultivo fueron de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C.

C₁ 3.5.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Las extracciones de ARN se realizaron con el kit Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek), a partir del material vegetal de 6 plantas de tabaco de cada línea. Además se extrajo por separado el ARN de raíces, tallos y hojas.

Las muestras de ARN se cuantificaron empleando un NanoDropTM 1000 de Thermo Fisher Scientific, y su calidad se determinó con este mismo aparato y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %.

Con el objetivo de eliminar de las muestras de ARN posibles restos de ADN genómico, se trataron con ADNasa I (libre de ARNasa) de Thermo Fisher Scientific, siguiendo las especificaciones de la casa comercial, y a continuación se realizó una extracción con fenol:cloroformo (**Sambrook y Russell, 2006**).

Las muestras se cuantificaron nuevamente y se verificó su calidad. Además se comprobó que los posibles restos de ADN genómico habían sido eliminados. Esto se llevó a cabo mediante la realización de una PCR, en la que se usaron 2 µl de cada una de estas muestras como molde y como cebadores los empleados en la clonación del gen *uidA* (apartado C₁ 3.2.1). Los demás parámetros empleados en esta PCR coinciden con los que se detallan en la **Tabla C₁ 2**. En ninguno de los casos se produjo amplificación, confirmándose la total eliminación de posibles restos de ADN genómico.

Por último se llevó a cabo la síntesis de ADNc, a partir de 400 ng de ARN y empleando el kit TruScriptTM First Strand cDNA Synthesis kit for mRNA (Norgen Biotek).

C₁ 3.5.2 PCR cuantitativa en tiempo real

Los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real se llevaron a cabo en el equipo iCycler iQ (BIO RAD) de la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña, usando FastStart SYBR Green Master de Roche. Para su realización se emplearon dos parejas de cebadores, cuyas secuencias se muestran a continuación, una de ellas permite la amplificación de una región del gen de interés (gen *uidA*), mientras que la otra permite la amplificación de una región de un gen de actina (GenBank: U60495.1), que se usó como gen de referencia.

Gen de interés (*uidA*)

5'-TAATGTTCTGCGACGCTCAC-3'

5'-GGCACAGCACATCAAAGAGA-3'

Gen de referencia (GenBank: U60495.1)

5'-CAGTGTCTGGATCGGAGGAT-3'

5'-CCTGCTGGAATGTGCTAAGG-3'

Las condiciones bajo las que se realizaron los ensayos de PCR fueron las recogidas en la **Tabla C₁ 3**.

Tabla C₁ 3. Condiciones bajo las que se realizaron los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real.

Mezcla de PCR		Programa de PCR	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
FastStart SYBR Green Master	1X	Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Cebador <i>forward</i>	0,3 µM	Desnaturalización	95	30 s	
Cebador <i>reverse</i>	0,3 µM	<i>Annealing</i>	55	30 s	40
ADNc	2 ng	Extensión	72	1 min	
Agua MilliQ	Hasta 20 µl	Extensión final	72	10 min	1
Volumen total	20 µl				

Posteriormente, para determinar la presencia de productos inespecíficos y/o dímeros de cebador que pudieran formarse durante la amplificación, se realizaron las curvas de fusión (curvas de *melting*) con los siguientes parámetros: un ciclo a 95 °C durante 1 minuto y uno a 60 °C durante 1 minuto, seguido por un aumento de temperatura de hasta 95 °C en incrementos de 0,5 °C cada 10 segundos.

C₁ 3.5.3 Análisis de los datos obtenidos en los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real

En los ensayos mediante PCR cuantitativa a tiempo real cada muestra de ADNc fue ensayada por duplicado. Los datos de C_t (*threshold cycle*), obtenidos empleando el iCycler iQ Software (BIO RAD), fueron procesados mediante el programa informático REST (Pfaffl *et al.*, 2002), para obtener los valores de expresión relativa del gen *uidA* y los errores estándar. En la realización de estos cálculos se consideró como controles a las plantas de tabaco transgénicas que portaban la construcción P35S/TCaMV. El análisis estadístico de estos datos se llevó a cabo también con el programa informático REST.

El cálculo de las varianzas se realizó empleando el programa informático SPSS.

C₁ 3.6. Prueba histoquímica de la β -glucuronidasa

La prueba histoquímica de la β -glucuronidasa se llevó a cabo en plantas de tabaco transgénicas de diferentes edades, que fueron cultivadas en tierra, desde semillas, bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C.

Para la realización de esta prueba, los tejidos vegetales se infiltraron, mediante la aplicación de vacío, con la siguiente solución en agua MilliQ: 3,72 g/l EDTA sal disódica dihidrato, 8,8 g/l fosfato sódico monobásico, 0,21 g/l potasio hexacianoferrato(II) trihidrato, 1 ml/l Tritón X-100, a la que se ajustó el pH a 7,0 para posteriormente añadir 500 mg/l de X-Gluc (5-bromo 3-cloro 3-indolil β -D-ácido glucurónico). Una vez infiltrados, se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se eliminaron las clorofilas mediante sucesivos baños del material vegetal en etanol 70 % y en agitación.

Posteriormente se procedió a la visualización y fotografiado de las muestras. Todas las observaciones y fotografías se realizaron con un microscopio estereoscópico SMZ 150 dotado de una cámara digital Nikon DXM1200.

C₁ 4. Resultados y discusión

C₁ 4.1. Selección de un gen de actina de *Vitis vinifera* que se exprese de forma constitutiva y a altos niveles

El primer paso, para la selección de un gen de actina de vid con las características deseadas, consistió en la identificación de los genes de actinas en esta especie. Para ello se recurrió a los datos recogidos en el trabajo de **Grimplet et al. (2012)**, en el que realizan una predicción de los genes de la vid y la consiguiente anotación funcional, y a la información proporcionada por la base de datos del genoma de la vid del CRIBI Biotechnology Center (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>). Así, se pudieron identificar 6 posibles genes de actinas en la vid.

El siguiente paso consistió en averiguar cuál de esos genes tiene un patrón de expresión que se ajuste a lo que se está buscando, y es que las actinas están codificadas por una familia multigénica cuyos miembros muestran patrones de expresión diferentes, tal y como se ha visto en múltiples especies vegetales entre las que podemos citar al arroz (**McElroy et al., 1990a; Reece et al., 1990**), soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (**McLean et al., 1990**), algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (**Li et al., 2005**), chopo (*Populus trichocarpa* Torr. y A. Gray ex. Hook.) (**Zhang et al., 2010**) y píceas comunes (*Picea abies* L. (Karst.)) (**Schwarzerová et al., 2010**).

Estudios filogenéticos apoyan la separación de las actinas de angiospermas en dos clases, la de las actinas vegetativas y la de las actinas reproductivas, y esta separación también refleja, a grandes rasgos, las diferencias en sus patrones de expresión (**An et al., 1999**). Así, en *Arabidopsis thaliana*, que es la especie de la que se posee la información más completa, la familia génica de las actinas se compone de 10 miembros, 8 de los cuales codifican para proteínas funcionales, mientras que los 2 restantes parecen ser pseudogenes. Esos 8 genes, a su vez, pueden dividirse atendiendo a análisis filogenéticos y a sus patrones de expresión en dos clases, la de las actinas reproductivas, a la que pertenecen *AtACT1*, *AtACT3*, *AtACT4*, *AtACT11*, *AtACT12*, y la de las actinas vegetativas, dentro de la que se engloban *AtACT2*, *AtACT7*, *AtACT8* (**McDowell et al., 1996b; Meagher et al., 1999**). En la **Tabla C₁ 4** se recogen sus diferentes patrones de expresión, indicando en qué tejidos se expresan y con qué intensidad.

Tabla C₁ 4. Resumen del patrón de expresión de los genes de actina de *A. thaliana*.

	Vegetative												Reproductive						
	Ger seed	Seed coat	Hypo	Cotyl	Leaf	Root tip	Root cort epid	Vas cyl	Meri stem	Sepal	Petal	Fila	Pol and tube	Carp	Trans tis	Endo	Ovule	Emb	Dev seed sil
<i>AtACT7</i>	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	++	+++	++	++	+++	+/-c						
<i>AtACT2</i>	+++		+/-		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+/-d						
<i>AtACT8</i>	+/-			++	+++	++	++	++	++				+/-d						
<i>AtACT11</i>			b+			+		+/-	++				++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>AtACT1</i>						+		+/-	++				+++	+			e++	e+	
<i>AtACT3</i>						+		+/-	++				++	+			e++	e+	
<i>AtACT4</i>									+/-				++						
<i>AtACT12</i>						+/-		+/-					++						

Tabla modificada de **Meagher *et al.* (1999)**.

Ger seed: germinating seed Hypo: hypocotyl Cotyl: cotyledon Leaf: young and/or mature leaves Root cort epid: root cortical and epidermal tissue Vas cyl: vascular cylinder Meristem: floral or vegetative meristem Fila: filament at base of anther Pol and tube: mature pollen and pollen tube Carp: developing carpel Trans tis: transmittal tissue Endo: endosperm Ovule: young developing ovules Emb: embryo Dev seed sil: developing seed and silique

b: *AtACT11* se expresa a niveles altos en hipocótilos etiolados c: *AtACT7* parece que se expresa en estadios tardíos del desarrollo del polen y de forma transitoria (resultados no concluyentes) d: se detecta ARNm de *AtACT2* y *AtACT8* pero las fusiones de sus promotores con genes reporteros no se expresan en plantas transgénicas e: fusiones de *AtACT1* y *AtACT3* con gen reportero se expresan en óvulos de plantas transgénicas

Teniendo en cuenta esta información, se realizó un alineamiento de las secuencias de los genes de actinas de vid y de los 8 genes de actinas de *A.thaliana*, para a partir de él construir un árbol de distancias (**Figura C₁ 3**), con la finalidad de conocer cuáles de los genes de vid corresponden a actinas vegetativas y cuáles a actinas reproductivas.

Atendiendo a la estructura predicha para cada uno de estos genes de vid (la estructura de los genes de actinas de plantas superiores está bastante conservada, tal y como se muestra en la **Figura C₁ 4**), recogidas en la base de datos del CRIBI Biotechnology Center, así como a la información aportada por el árbol de distancias (**Figura C₁ 3**), se decidió que el gen VIT_04s0044g00580 de vid podría ser realmente un gen de actinas y además cumplir las características deseadas de expresión constitutiva y a altos niveles.

Por una parte, la estructura predicha para este gen concuerda con la estructura típica de los genes de actinas de las plantas superiores (**Figuras C₁ 4 y C₁ 6A**), lo que apoya que se trate realmente de un gen de actina.

Por otra parte, observando el árbol de distancias (**Figura C₁ 3**), se puede apreciar que el gen de *Arabidopsis* al que más se asemeja VIT_04s0044g00580 es el de la actina 7 (*AtACT7*), lo que concuerda con su anotación como gen de la actina 7 de vid.

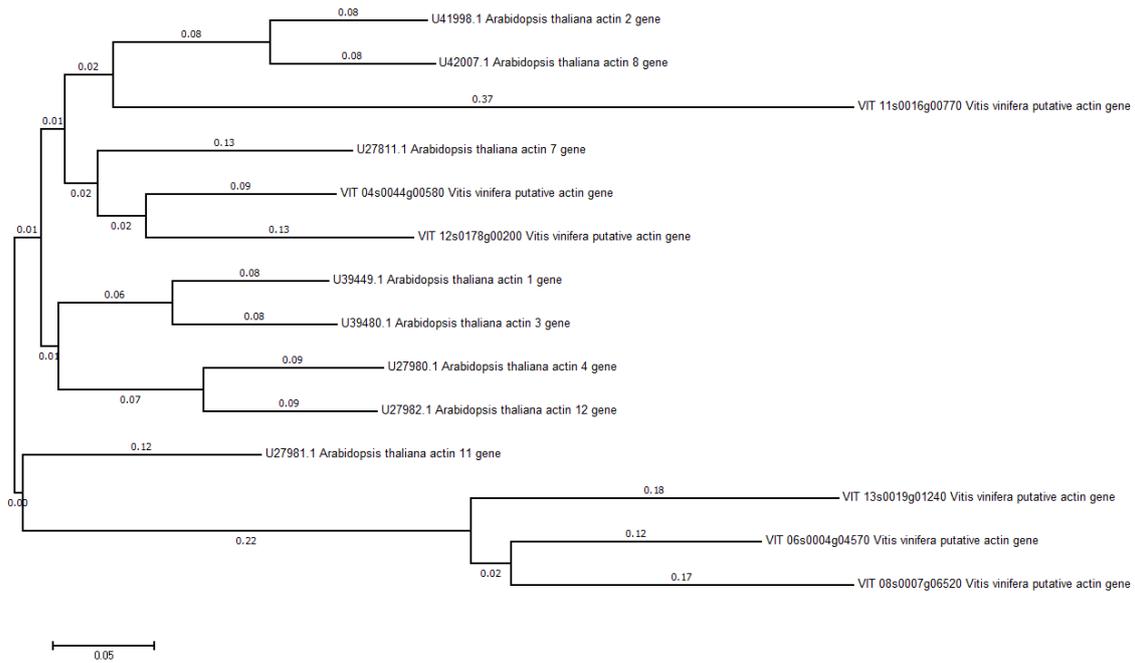


Figura C₁ 3.- Árbol de distancias, por el método de *Neighbor-Joining*, en el que se muestran las semejanzas entre los genes de las actinas de *Arabidopsis thaliana* y los genes de actinas de vid. El árbol está a escala, con las longitudes de las ramas en las mismas unidades a las de las distancias evolutivas empleadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas usando el método de *Maximum Composite Likelihood* (Tamura *et al.*, 2004) y están en las unidades de número de sustituciones de bases por sitio. Todas las posiciones que contenían *gaps* y *missing data* fueron eliminadas. Todos estos análisis fueron realizados con MEGA7.

Esto podría ser indicativo de que VIT_04s0044g00580 y *AtACT7* cumplen el mismo papel en las plantas, el primero en vid y el segundo en *Arabidopsis*, y por tanto cabría esperar que sus patrones de expresión fuesen semejantes. Recordemos que *AtACT7* codifica para una actina vegetativa, que se expresa en buena parte de los tejidos de la planta y a altos niveles (Tabla C₁ 4) (Meagher *et al.*, 1999), sobre todo en el caso de los tejidos jóvenes (Gilliland *et al.*, 2003). Además se ha visto que su expresión aumenta ante la producción de heridas (McDowell *et al.*, 1996a) y que su homólogo en *Malva pusilla* Sm. incrementa su nivel de expresión bajo infección fúngica (Jin *et al.*, 1999).



Figura C₁ 4.- Representación esquemática de la estructura típica de los genes de actinas de plantas. Las regiones que se traducen se muestran en gris oscuro y las que se transcriben pero no se traducen en gris claro. Imagen modificada de Šljajčero^{va} *et al.* (2012).
L: leader exon Li: leader intron 1-4: exón 1-exón 4 1i-3i: intrón 1-intrón 3

Si este fuera también el patrón de expresión de VIT_04s0044g00580 (al que se nombrará en el texto como gen de la actina 7 de vid) cumpliría los requerimientos, de gen de expresión alta y constitutiva, buscados. Además, un incremento en sus niveles de expresión ante el ataque de hongos y producción de heridas sería algo especialmente beneficioso para el uso de sus secuencias reguladoras en la obtención de líneas transgénicas con una mayor resistencia a patógenos.

Para confirmar que el patrón y niveles de expresión del gen seleccionado eran realmente los deseados, se recurrió a los datos disponibles de expresión génica en la vid. Tras revisar los datos de expresión del atlas hecho con los microarrays de NimbleGen en *Vitis vinifera* var. Corvina (Fasoli *et al.*, 2012), se encontró que el nivel de expresión medio del gen de la actina 7, teniendo en cuenta los valores obtenidos en todos los tejidos analizados, es superior al nivel de expresión medio del 99 % de los genes de la vid. El tejido donde muestra los menores niveles de expresión es en hojas senescentes, y aun así su nivel de expresión en este tejido es superior al del 94,18 % de los genes de la vid. Estos datos apoyan que realmente nos encontramos ante un gen de alta expresión.

Observando la **Figura C₁ 5**, en la que se representa la diferencia entre el nivel de expresión del gen de la actina 7 de vid en cada tejido y estado del desarrollo y el nivel de expresión medio de este gen, se puede apreciar que además de expresarse en todos los tejidos y estados del desarrollo analizados, su nivel de expresión en cada uno de ellos es próximo al nivel de expresión medio del gen. Solo en hojas senescentes la diferencia entre ambos valores está fuera del rango comprendido entre -1 y 1. Otra prueba de la homogeneidad de los niveles de expresión del gen, en los diferentes tejidos y estados del desarrollo, es el hecho de que no existen diferencias significativas (t de Student $P \geq 0,05$) entre los valores de expresión en el tejido donde más se expresa (yema latente) y en el que menos (hojas senescentes). Así, se pudo confirmar que el gen de la actina 7 se expresa en todos los tejidos y estados del desarrollo analizados y que, además, sus niveles de expresión son homogéneos y altos, dado que no difieren en gran medida del nivel de expresión medio del gen, el cual constituye un valor de expresión alto, superior al nivel de expresión medio del 99 % de los genes de la vid.

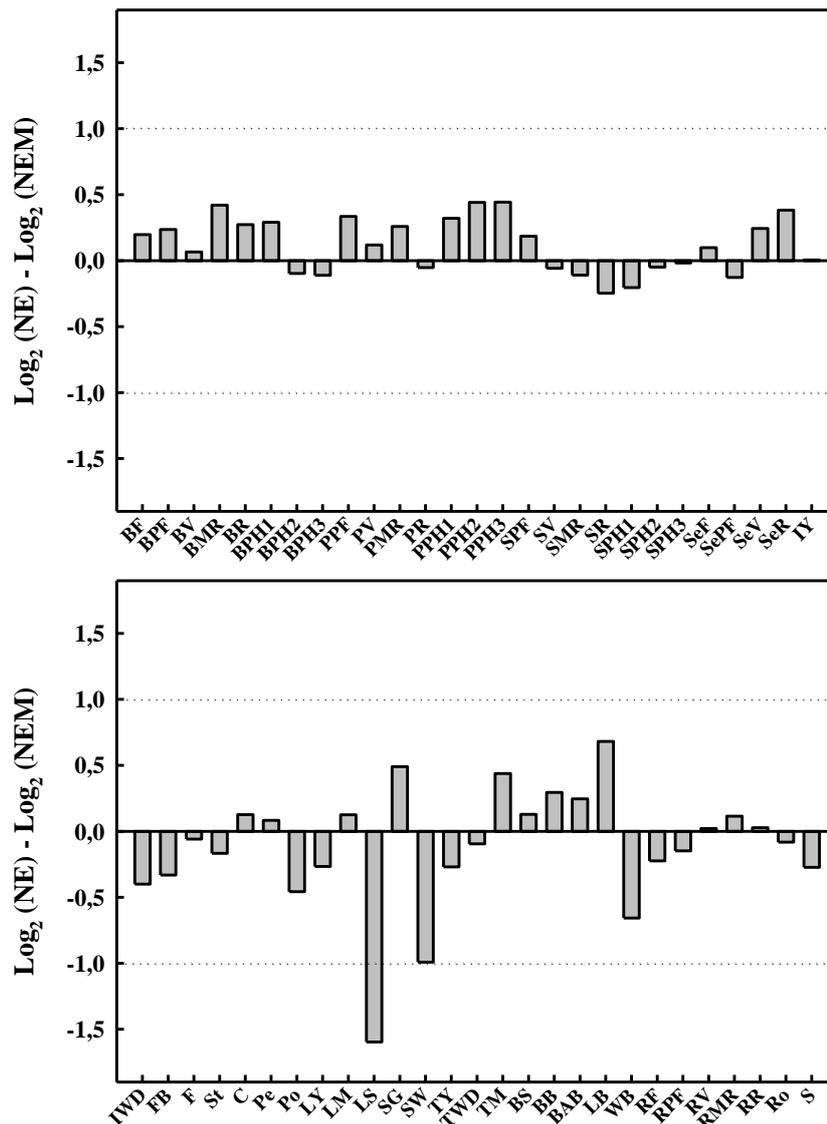


Figura C₁ 5.- Diferencia entre el nivel de expresión (NE) del gen de la actina 7 de vid en diferentes tejidos y estados del desarrollo, y el nivel de expresión medio (NEM) de este gen. Los datos se obtuvieron del atlas de expresión hecho con los microarrays de NimbleGen en *Vitis vinifera* var. Corvina (Fasoli *et al.*, 2012).

BF: berry fruit set BPF: berry post fruit set BV: berry veraison BMR: berry medium ripe BR: berry ripe BPH1: berry post harvest withering 1 month BPH2: berry post harvest withering 2 months BPH3: berry post harvest withering 3 months PPF: pulp post fruit set PV: pulp veraison PMR: pulp medium ripe PR: pulp ripe PPH1: pulp post harvest withering 1 month PPH2: pulp post harvest withering 2 months PPH3: pulp post harvest withering 3 months SPF: skin post fruit set SV: skin veraison SMR: skin medium ripe SR: skin ripe SPH1: skin post harvest withering 1 month SPH2: skin post harvest withering 2 months SPH3: skin post harvest withering 3 months SeF: seed fruit set SePF: seed post fruit set SeV: seed veraison SeR: seed ripe IY: inflorescence young IWD: inflorescence well developed FB: flowering begins (10% caps off) F: flowering (50% caps off) St: Stamen C: Carpel Pe: Petal Po: Pollen LY: leave young LM: leave mature LS: leave senescent SG: stem green SW: stem woody TY: tendril young TWD: tendril well developed TM: tendril mature BS: bud swell BB: Bud burst BAB: bud after burst LB: latent bud WB: winter bud RF: rachis fruit set RPF: rachis post fruit set RV: rachis veraison RMR: rachis medium ripe RR: rachis ripe Ro: root S: seedling

C₁ 4.2. Aislamiento del promotor y del terminador del gen de la actina 7 de vid

Una vez seleccionado el gen de la actina 7, y verificado que cumple las características de expresión constitutiva y a altos niveles, se procedió a establecer cómo delimitar su promotor y su terminador.

Como puede observarse en la **Figura C₁ 6A**, el gen de la actina 7 de vid muestra la estructura típica de los genes de actinas de las plantas superiores. Estos poseen un exón que no se traduce, conocido como *leader exon*, seguido por un intrón, el *leader intron*, que también forma parte de la 5'UTR y que se ubica 10-13 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio ATG, además, poseen 3 intrones localizados en la región codificante (**Pearson y Meagher, 1990; Shah et al., 1983**).

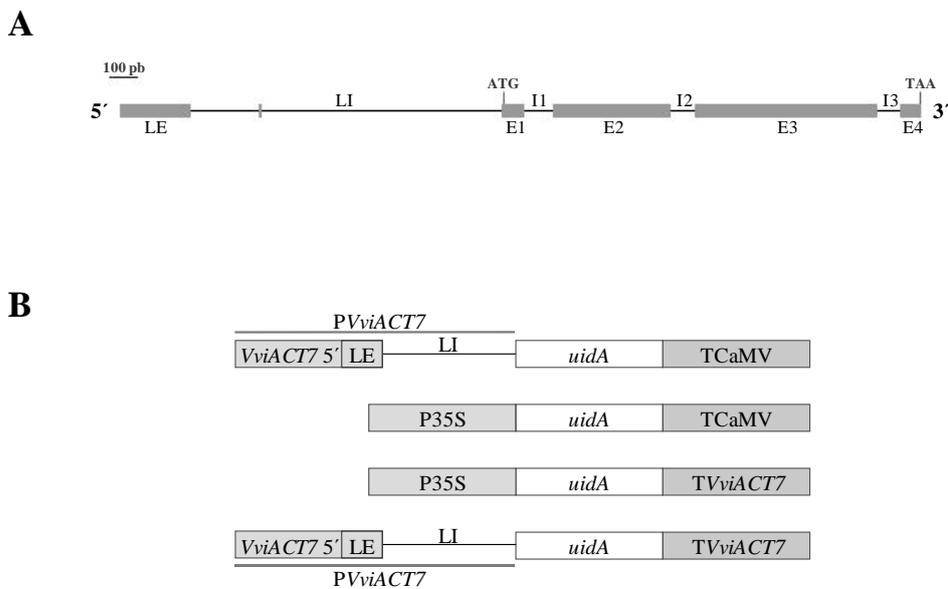


Figura C₁ 6.- A: representación esquemática y a escala del gen de la actina 7 de vid, según se muestra en la base de datos del genoma de la vid del CRIBI Biotechnology Center. B: representación de las construcciones empleadas para la obtención de las plantas de tabaco transgénicas.

E1-E4: exón 1-exón 4 I1-I3: intrón 1-intrón 3 LE: *leader exon* del gen de la actina 7 de vid LI: *leader intron* del gen de la actina 7 de vid VviACT7 5': secuencias aguas arriba del *leader exon*, que comprenden el núcleo del promotor (*core promoter*) y sus regiones proximal (*proximal promoter*) y distal (*distal promoter*) PVviACT7: promotor del gen de la actina 7 de vid TVviACT7: terminador del gen de la actina 7 de vid uidA: gen uidA de *Escherichia coli* P35S: promotor CaMV35S (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor) TCaMV: terminador CaMV (terminador del virus del mosaico de la coliflor)

Existen múltiples datos en la literatura que asignan al intrón de la 5'UTR un importante papel regulador de la expresión. En protoplastos de arroz transformados de forma

transitoria con una construcción en la que el gen de la β -glucuronidasa se encontraba bajo el control del promotor del gen de la actina 1 de arroz, se vio que era totalmente necesario para la correcta expresión del transgén que dicho promotor incluyese el *leader intron*, de hecho si esto era así el gen de la β -glucuronidasa se expresaba a altos niveles (McElroy *et al.*, 1990b). En *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch y Schimp también se observó que, para lograr unos niveles altos de expresión de los transgenes empleando los promotores de los genes de actinas *PpAct1*, *PpAct5* y *PpAct7*, era necesario incluir sus respectivos intrones 5' (Weise *et al.*, 2006). Por otra parte, en *A. thaliana* la expresión del gen de la β -glucuronidasa bajo el control del promotor de *AtACT2* varía dependiendo de si este porta su *leader intron* o no, así, la presencia del intrón no solo incrementa la expresión del transgén, sino que además es necesario para que este se exprese en la zona meristemática apical del tallo y ápices de las raíces (Jeong *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta toda esta información a la hora de delimitar el promotor del gen de la actina 7 de vid (*PVviACT7*), se decidió incluir el *leader intron*, de modo que el promotor aislado consta de 1600 pb y se extiende hasta la posición inmediatamente anterior al codón de inicio (ATG). Por su parte, el terminador del gen de la actina 7 acotado (*TVviACT7*) consta de 1481 pb, comenzando a 3 nucleótidos de la última base del codón de stop (TAA).

C₁ 4.3. Evaluación del potencial del promotor y el terminador acotados para controlar la expresión de transgenes

Con el objetivo de comprobar el potencial de las secuencias reguladoras aisladas (*PVviACT7* y *TVviACT7*) para controlar la expresión de transgenes, se fusionaron al gen reportero *uidA* de *Escherichia coli*. Así, se obtuvieron las construcciones que se detallan en la **Figura C₁ 6B**, que comprenden diferentes combinaciones de promotor y terminador. Con estas construcciones se transformaron de forma estable plantas de tabaco, y se analizó, para cada construcción, la expresión del gen reportero en 3 líneas homocigotas independientes de la T₂, usando para ello la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Como controles se usaron las líneas transgénicas que portan la construcción con promotor CaMV35S y terminador CaMV.

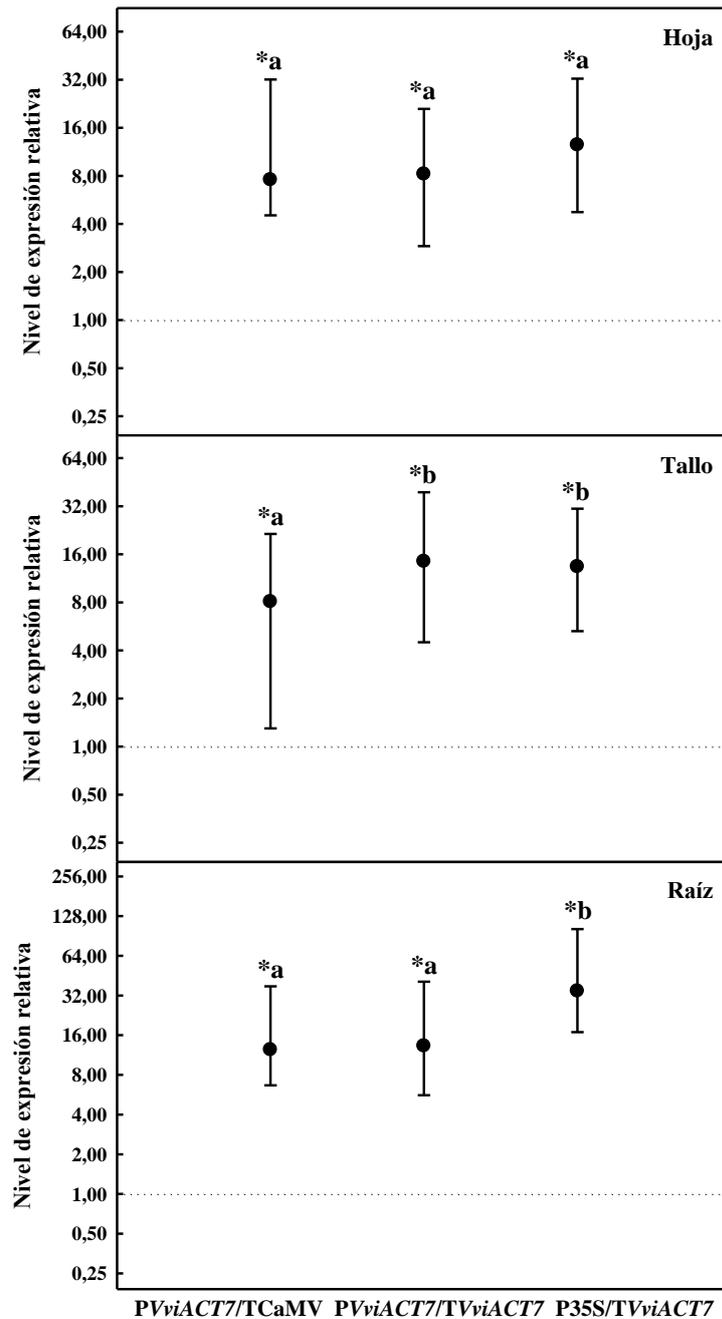


Figura C₁ 7.- Nivel de expresión relativa del gen *uidA* bajo el control de diferentes combinaciones de promotor y terminador. Los datos se obtuvieron para hoja, tallo y raíz de las plantas de tabaco transgénicas que portaban las diferentes construcciones. Los análisis de expresión génica se realizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real y los datos se procesaron con el programa informático REST. Los círculos representan el nivel medio de expresión relativa y las barras el error estándar, calculados a partir de los datos obtenidos del análisis de expresión en tres líneas transgénicas para cada construcción. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$). Las letras indican diferencias significativas (diferente letra) entre las diferentes construcciones ($P < 0,05$). La línea de puntos representa el nivel de expresión del gen *uidA* en las plantas control (plantas con construcción P35S/TCaMV).

PVviACT7: promotor del gen de la actina 7 de vid TVviACT7: terminador del gen de la actina 7 de vid
 P35S: promotor CaMV35S TCaMV: terminador CaMV

En todos los órganos analizados (hoja, tallo y raíz) la expresión del gen *uidA* controlada por al menos una secuencia reguladora de *uid* resultó ser superior, de forma significativa, a la expresión del gen *uidA* controlada por el promotor CaMV35S y el terminador CaMV (**Figura C₁ 7**). Esto concuerda con datos obtenidos de la bibliografía, que resaltan que a pesar del uso generalizado de las secuencias reguladoras de origen viral y bacteriano para controlar la expresión de los transgenes, estas no son siempre la mejor opción. La idoneidad de las secuencias reguladoras depende del sistema transgén/especie vegetal, hecho del que existen numerosos ejemplos en la literatura.

Así, en lechugas (*Lactuca sativa* L.) transgénicas, la expresión del gen de la proteína modificadora del sabor miraculina, dirigida por los promotores CaMV35S o EL2-35S- Ω , acompañados por el terminador del gen de la nopalina sintasa (*nos*) de *Agrobacterium tumefaciens*, es detectada en las plantas de las generaciones T₁ y T₂. Sin embargo, el nivel de expresión del gen de la miraculina en estas plantas es al menos 10 veces menor que en las plantas de la T₀ (**Sun et al., 2006**). Además, cuando el gen de la miraculina está bajo el control del promotor y del terminador de la ubiquitina de lechuga, su nivel de expresión y la cantidad de proteína (miraculina) en las lechugas transgénicas es mayor y más estable que cuando este gen está controlado por el promotor CaMV35S y el terminador *nos* (**Hirai et al., 2011**). En contraposición, el uso del promotor CaMV35S y del terminador *nos* para controlar la expresión del gen de la miraculina en tomates (*Solanum lycopersicum* L.) transgénicos, conduce a una expresión estable del transgén a través de las generaciones (**Sun et al., 2007; Yano et al., 2010**).

Otro ejemplo que apoya el empleo de promotores de origen vegetal en transformación genética de lechuga viene reflejado en el trabajo de **McCabe et al. (1999)**, quienes encontraron que el uso del promotor de 784 pb del gen de plastocianina de guisante (*Pisum sativum* L.) (*petE*) para dirigir la expresión del gen *bar* en lechugas transgénicas, hacía que la herencia del carácter resistencia a herbicidas fuese más estable, comparado con los casos en que el gen *bar* se encontraba bajo el control del promotor CaMV35S.

También existen trabajos en otras especies, distintas a lechuga, en que el uso de secuencias reguladoras de origen vegetal se erigió como la mejor alternativa para controlar la expresión del transgén, frente al empleo de las clásicas secuencias de origen viral y bacteriano. Un ejemplo lo constituyen los ensayos de transformación genética transitoria realizados en *Marchantia polymorpha* L., en que el uso del promotor endógeno del gen del factor de elongación 1 α (*MpEF1 α*) y del terminador endógeno del

gen *FLOWERING LOCUS T1 (MpFT1)* condujo a unos mayores niveles de expresión de los transgenes, en comparación con el promotor CaMV35S y el terminador *nos*, respectivamente (**Nagaya et al., 2011**). Además, en plantas de *A. thaliana* y *Trifolium repens* L. transgénicas, se observó que los niveles de expresión del gen de la β -glucuronidasa eran mayores si este iba acompañado por el promotor del gen *MtHP* de *Medicago truncatula* Gaertn. en lugar de por el promotor CaMV35S (**Xiao et al., 2005**). Respecto a las tres construcciones con elementos de vid, en hojas (**Figura C₁ 7**) no existen diferencias significativas en los niveles de expresión del gen *uidA* independientemente del promotor y del terminador empleados. En raíz (**Figura C₁ 7**) el empleo del promotor CaMV35S y de *TVviACT7* es la opción que conduce a unos mayores niveles de expresión del gen reportero. En tallo (**Figura C₁ 7**) esta última construcción, junto con la que consta de promotor y terminador de vid, son las que proporcionan unos mayores niveles de expresión del transgén.

Con estos resultados queda patente la importancia de la elección del terminador, y no solo del promotor, y es que la combinación del promotor CaMV35S con *TVviACT7* lleva a unos niveles de expresión mayores, en todos los órganos analizados, que la combinación promotor CaMV35S y terminador CaMV. En el caso de *PVviACT7*, los niveles de expresión no se ven alterados por el uso de un terminador u otro en hoja y raíz, no así en tallo, donde son mayores si este va acompañado por *TVviACT7*.

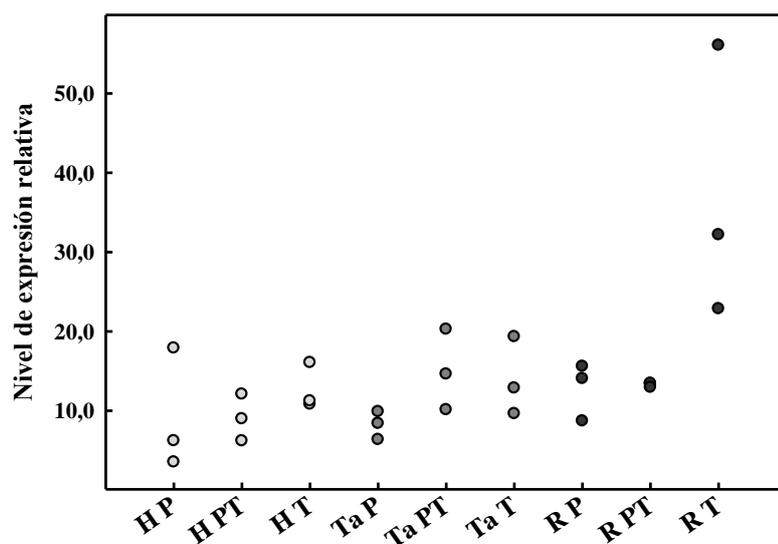
Tradicionalmente, en el diseño de construcciones de ADN para transformación genética no se daba demasiada importancia a la elección del terminador, sin embargo, se ha visto que estas secuencias son muy importantes en la modulación de los niveles de expresión de los transgenes. Los terminadores son necesarios para la terminación de los transcritos de ARN y para su poliadenilación, además, juegan un papel clave en el procesamiento, localización, estabilidad y traducción del ARNm (**Proudfoot, 2004; Gilmartin, 2005**). Los transcritos terminados de forma aberrante son unos inductores muy eficientes del silenciamiento génico (**Nicholson y Srivastava, 2009**). **Ingelbrecht et al. (1989)** analizaron la expresión del gen de la neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) acompañado por diferentes terminadores de origen vegetal, y encontraron que los niveles de expresión variaban hasta unas 60 veces entre las diferentes construcciones. **Nagaya et al. (2010)** también encontraron que construcciones con el mismo promotor y diferentes terminadores llevaban a diferentes niveles de expresión del transgén.

Atendiendo únicamente a los datos reflejados en la **Figura C₁ 7**, parece que la combinación que proporciona unos niveles medios de expresión más altos es la del

promotor CaMV35S junto con el terminador de vid. Sin embargo, algo muy importante a tener en cuenta en la producción de plantas transgénicas es buscar aquellas secuencias reguladoras que confieran una mayor consistencia en los niveles de expresión del transgén en las distintas líneas transgénicas. Un problema muy habitual en transformación genética consiste en la obtención de diferentes niveles de expresión del transgén entre plantas transformadas con la misma metodología y empleando la misma construcción, y uno de los factores que influye en esta variabilidad son las secuencias reguladoras que acompañan al gen introducido (**Butaye et al., 2005; Park et al., 2010; De Bolle et al., 2003**). El hecho de no conseguir unos niveles de expresión homogéneos puede llevar a situaciones indeseadas, como el tener que enfrentarse a tediosos *screening* para lograr encontrar líneas con el nivel de expresión del transgén adecuado o a una gran variabilidad en el fenotipo de los transformantes (**Butaye et al., 2005; Birch, 1997**).

Por este motivo, además de analizar el nivel de expresión del gen *uidA* determinado por las diferentes combinaciones de promotor y terminador, también se decidió evaluar la estabilidad de los niveles de expresión del transgén entre las líneas que portan la misma construcción. Para ello se obtuvieron los niveles de expresión relativa del gen *uidA* de forma independiente en cada línea, valores que recoge la **Figura C₁ 8**, y se calculó la varianza entre estos valores para cada construcción (**Figura C₁ 8**). Los resultados de este cálculo indican que la construcción que conduce a una mayor estabilidad en los niveles de expresión del transgén es la que contiene el promotor y el terminador de vid, dado que la mayor varianza observada, en los tres órganos analizados, para esta construcción es de 25,879, inferior a los mayores valores obtenidos en el caso de la construcción con el promotor de vid y el terminador CaMV (58,481), y en el de la construcción con el promotor CaMV35S y el terminador de vid (293,421).

Teniendo esto en cuenta, la combinación PV*viACT7* y TV*viACT7* parece la mejor opción. En todos los órganos analizados conduce a unos niveles de expresión del gen *uidA* superiores a los obtenidos empleando la construcción que consta de promotor CaMV35S y terminador CaMV. Además, si se compara con las dos construcciones que combinan una secuencia de origen viral y otra de vid, tan solo la combinación promotor CaMV35S y terminador de vid provoca unos niveles de expresión del gen *uidA* superiores, y solo en el caso de raíz, hecho que se ve enormemente compensado por la mayor estabilidad en los niveles de expresión del transgén entre las distintas líneas (**Figura C₁ 8**) que confiere el uso del promotor y el terminador de vid.



	HP	HPT	HT	Ta P	Ta PT	Ta T	RP	RPT	RT
Varianza	58,481	8,706	8,521	3,127	25,879	24,438	13,088	0,077	293,421

Figura C₁ 8.- En el gráfico de la figura se representa el nivel de expresión relativa del gen *uidA* en cada una de las tres líneas que portan cada construcción, y en tres órganos diferentes (hoja, tallo y raíz). Los valores de expresión fueron obtenidos mediante PCR a tiempo real y procesados con el programa informático REST. En la tabla de la parte inferior de la figura se recogen las varianzas entre estos valores.

H: hoja Ta: tallo R: raíz P: PV*viACT7*/TCaMV PT: PV*viACT7*/TV*viACT7* T: P35S/TV*viACT7*

Una vez evaluado el potencial de las diferentes combinaciones de secuencias reguladoras, y decidido que el empleo de PV*viACT7* y TV*viACT7* parece la mejor opción, se llevó a cabo el ensayo histoquímico de la β -glucuronidasa en plantas de tabaco transgénicas en que el gen *uidA* se encontraba controlado por estas secuencias reguladoras de vid. El motivo de la realización de esta prueba era ratificar que el transgén se estaba expresando de forma constitutiva, como un último paso de validación del uso de las secuencias de vid.

Como puede apreciarse en la **Figura C₁ 9**, se observó una coloración azul intensa a lo largo de toda la planta y en los diferentes estados de desarrollo ensayados, lo que confirma que PV*viACT7* y TV*viACT7* conducen la expresión constitutiva del gen *uidA* en estas plantas de tabaco. Este dato constituyó el último paso para, junto con los demás resultados comentados a lo largo de este Capítulo 1, señalar a PV*viACT7* y TV*viACT7* como una buena alternativa para la expresión constitutiva de transgenes a altos niveles y de forma estable.

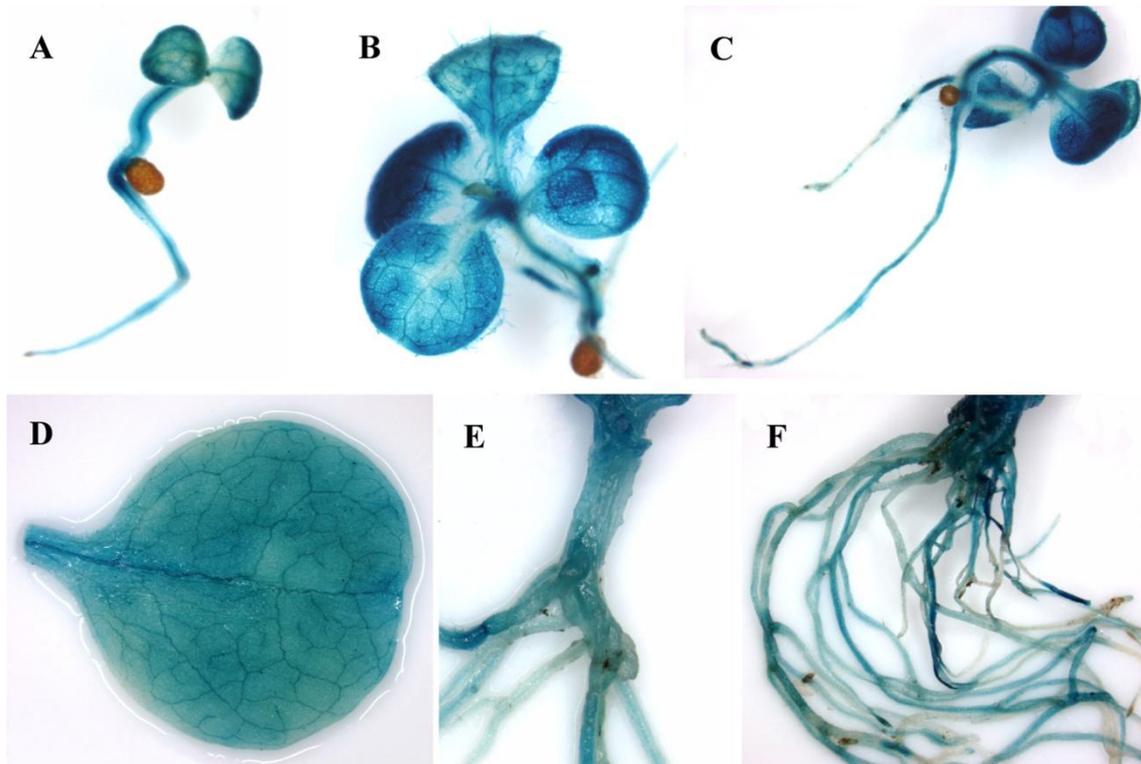


Figura C₁ 9.- Ensayo histoquímico de la β -glucuronidasa en plantas de tabaco transgénicas que portan la construcción compuesta por el gen *uidA* bajo el control del promotor y del terminador del gen de la actina 7 de vid. A: plántula de 1 semana. B y C: plántula de 15 días. D: hoja de planta de 1 mes. E: tallo y base de la raíz de planta de un mes. F: raíces de planta de 1 mes.

C₁ 5. Resumen

En este capítulo se han aislado un promotor y un terminador del gen de la actina 7 de vid, y se ha evaluado su capacidad para controlar la expresión del gen *uidA* en plantas de tabaco transgénicas. Los análisis llevados a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real revelaron que estas secuencias reguladoras de vid son capaces de dirigir la expresión del transgén en todos los órganos analizados y a altos niveles. Además, los resultados aportados por el ensayo histoquímico de la β -glucuronidasa confirmaron que el gen *uidA*, acompañado por el promotor y el terminador de vid, se expresaba de forma constitutiva en los tabacos transgénicos.

Los datos obtenidos mediante PCR cuantitativa a tiempo real también permitieron conocer que, de todas las combinaciones de promotor y terminador testadas, el uso de ambas secuencias reguladoras de vid lleva a una mayor homogeneidad en los niveles de expresión del gen *uidA* entre las distintas líneas transgénicas. Probablemente, esto sea debido a que las demás construcciones testadas poseen al menos una de las secuencias reguladoras de origen viral que, según señalan múltiples trabajos en la literatura, son más proclives a desencadenar fenómenos de silenciamiento, en comparación con las secuencias reguladoras de origen vegetal (**Hirai *et al.*, 2011; Garabagi *et al.*, 2012**).

En conjunto, estos resultados apuntan a que el promotor y el terminador de vid aislados podrían constituir una buena alternativa como secuencias reguladoras para la expresión constitutiva y a altos niveles de los transgenes, incrementando el *pool* de secuencias reguladoras disponibles para su uso en biotecnología vegetal (tanto en investigación básica como en programas de mejora).

El siguiente paso deberá consistir en testar estas secuencias en otras especies vegetales, para asegurarse de que los resultados obtenidos en tabaco sean extrapolables a ellas. Esto cobra una especial importancia en el caso de la vid, al ofrecer la posibilidad de obtener vides intragénicas, mucho mejor aceptadas por la población que las transgénicas, que expresen de forma constitutiva un gen de interés.

C₁ 6. Bibliografía

Agudelo-Romero P, Erban A, Rego C, Carbonell-Bejerano P, Nascimento T, Sousa L, Martínez-Zapater JM, Kopka J y Fortes AM. 2015. Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *J Exp Bot* 66: 1769-1785.

An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S y Meagher RB. 1996. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J* 10: 107-121.

An SS, Möpps B, Weber K y Bhattacharya D. 1999. The origin and evolution of green algal and plant actins. *Mol Biol Evol* 16: 275-285.

Bhullar S, Chakravarthy S, Advani S, Datta S, Pental D y Burma PK. 2003. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping. *Plant Physiol* 132: 988-998.

Birch RG. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 297-326.

Butaye KMJ, Cammue BPA, Delauré SL y De Bolle MFC. 2005. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Mol Breed* 16: 79-91.

Chée R y Pool RM. 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. *Sci Hortic (Amsterdam)* 32: 85-95.

Clemente T. 2006. *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). En: Wang K (ed.). *Agrobacterium* Protocols. *Methods in Molecular Biology*, vol. 343. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. pp. 143-154.

De Bolle MFC, Butaye KMJ, Coucke WJW, Goderis IJWM, Wouters PFJ, van Boxel N, Broekaert WF y Cammue BPA. 2003. Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 165: 169-179.

Dhankher OP, Li Y, Rosen BP, Shi J, Salt D, Senecoff JF, Sashti NA y Meagher RB. 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nat Biotechnol* 20: 1140-1145.

Di Genova A, Almeida AM, Muñoz-Espinoza C, Vizoso P, Travisany D, Moraga C, Pinto M, Hinrichsen P, Orellana A y Maass A. 2014. Whole genome comparison between table and wine grapes reveals a comprehensive catalog of structural variants. *BMC Plant Biol* 14: 7.

Díaz-Riquelme J, Zhurov V, Rioja C, Pérez-Moreno I, Torres-Pérez R, Grimplet J, Carbonell-Bejerano P, Bajda S, Van Leeuwen T, Martínez-Zapater JM, Grbic M y Grbic V. 2016. Comparative genome-wide transcriptome analysis of *Vitis vinifera*

responses to adapted and non-adapted strains of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. BMC Genomics 17: 74.

Elmayan T y Vaucheret H. 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. Plant J 9: 787-797.

Fasoli M, Dal Santo S, Zenoni S, Tornielli GB, Farina L, Zamboni A, Porceddu A, Venturini L, Bicego M, Murino V, Ferrarini A, Delledonne M y Pezzotti M. 2012. The grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program. Plant Cell 24: 3489-3505.

Garabagi F, Gilbert E, Loos A, McLean MD y Hall JC. 2012. Utility of the P19 suppressor of gene-silencing protein for production of therapeutic antibodies in *Nicotiana* expression hosts. Plant Biotechnol J 10: 1118-1128.

Giddings G, Allison G, Brooks D y Carter A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. Nat Biotechnol 18: 1151-1155.

Gilliland LU, Pawloski LC, Kandasamy MK y Meagher RB. 2003. *Arabidopsis* actin gene *ACT7* plays an essential role in germination and root growth. Plant J 33: 319-328.

Gilmartin GM. 2005. Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends. Genes Dev 19: 2517-2521.

Grimplet J, Van Hemert J, Carbonell-Bejerano P, Díaz-Riquelme J, Dickerson J, Fennell A, Pezzotti M y Martínez-Zapater JM. 2012. Comparative analysis of grapevine whole-genome gene predictions, functional annotation, categorization and integration of the predicted gene sequences. BMC Res Notes 5: 213.

Gurr SJ y Rushton PJ. 2005. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? Trends Biotechnol 23: 275-282.

He C, Lin Z, McElroy D y Wu R. 2009. Identification of a rice *Actin2* gene regulatory region for high-level expression of transgenes in monocots. Plant Biotechnol J 7: 227-239.

Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S y Mullineaux PM. 2000a. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Plant Mol Biol 42: 819-832.

Hellens R, Mullineaux P y Klee H. 2000b. Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends Plant Sci 5: 446-451.

Hernández-García CM y Finer JJ. 2014. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. Plant Sci 217-218: 109-119.

Hirai T, Shohael AM, Kim YW, Yano M y Ezura H. 2011. Ubiquitin promoter-terminator cassette promotes genetically stable expression of the taste-modifying protein miraculin in transgenic lettuce. Plant Cell Rep 30: 2255-2265.

Holme IB, Wendt T y Holm PB. 2013. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol J* 11: 395-407.

Hussey PJ, Ketelaar T y Deeks MJ. 2006. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu Rev Plant Biol* 57: 109-125.

Ingelbrecht IL, Herman LM, Dekeyser RA, Van Montagu MC y Depicker AG. 1989. Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell* 1: 671-680.

Jaillon O, Aury JM, Noël B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pe ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F y Wincker P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-467.

Jelly NS, Valat L, Walter B y Maillot P. 2014. Transient expression assays in grapevine: a step towards genetic improvement. *Plant Biotechnol J* 12: 1231-1245.

Jeong YM, Jung EJ, Hwang HJ, Kim H, Lee SY y Kim SG. 2009. Roles of the first intron on the expression of *Arabidopsis thaliana* genes for actin and actin-binding proteins. *Plant Sci* 176: 58-65.

Jin S, Xu R, Wei Y y Goodwin PH. 1999. Increased expression of a plant actin gene during a biotrophic interaction between round-leaved mallow, *Malva pusilla*, and *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae*. *Planta* 209: 487-494.

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

Kumar S, Stecher G y Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874.

Li XB, Fan XP, Wang XL, Cai L y Yang WC. 2005. The cotton *ACTIN1* gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. *Plant Cell* 17: 859-875.

Li ZT, Kim KH, Jasinski JR, Creech MR y Gray DJ. 2012. Large-scale characterization of promoters from grapevine (*Vitis* spp.) using quantitative anthocyanin and GUS assay systems. *Plant Sci* 196: 132-142.

Matsushita T. 2011. A versatile method to prevent transcriptional gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol (Tsukuba)* 28: 515-519.

- McCabe MS, Schepers F, van der Arend A, Mohapatra U, de Laat AM, Power JB y Davey MR.** 1999. Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a *petE* promoter-*bar* gene compared with a CaMV 35S-*bar* gene. *Theor Appl Genet* 99: 587-592.
- McDowell JM, An YQ, Huang S, McKinney EC y Meagher RB.** 1996a. The *Arabidopsis ACT7* actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiol* 111: 699-711.
- McDowell JM, Huang S, McKinney EC, An YQ y Meagher RB.** 1996b. Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 142: 587-602.
- McElroy D, Rothenberg M, Reece KS y Wu R.** 1990a. Characterization of the rice (*Oryza sativa*) actin gene family. *Plant Mol Biol* 15: 257-268.
- McElroy D, Zhang W, Cao J y Wu R.** 1990b. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 2: 163-171.
- McGloughlin MN.** 2010. Modifying agricultural crops for improved nutrition. *N Biotechnol* 27: 494-504.
- McLean BG, Eubanks S y Meagher RB.** 1990. Tissue-specific expression of divergent actins in soybean root. *Plant Cell* 2: 335-344.
- Meagher RB, McKinney EC y Vitale AV.** 1999. The evolution of new structures: clues from plant cytoskeletal genes. *Trends Genet* 15: 278-284.
- Milli A, Cecconi D, Bortesi L, Persi A, Rinalducci S, Zamboni A, Zoccatelli G, Lovato A, Zolla L y Polverari A.** 2012. Proteomic analysis of the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*. *J Proteomics* 75: 1284-1302.
- Murashige T y Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Nagaya S, Kawamura K, Shinmyo A y Kato K.** 2010. The *HSP* terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol* 51: 328-332.
- Nagaya S, Takemura M y Ohyama K.** 2011. Endogenous promoter, 5'-UTR and transcriptional terminator enhance transient gene expression in a liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Biotechnol (Tsukuba)* 28: 493-496.
- Nicholson SJ y Srivastava V.** 2009. Transgene constructs lacking transcription termination signal induce efficient silencing of endogenous targets in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics* 282: 319-328.
- Park SH, Yi N, Kim YS, Jeong MH, Bang SW, Choi YD y Kim JK.** 2010. Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *J Exp Bot* 61: 2459-2467.

Pearson L y Meagher RB. 1990. Diverse soybean actin transcripts contain a large intron in the 5' untranslated leader: structural similarity to vertebrate muscle actin genes. *Plant Mol Biol* 14: 513-526.

Pfaffl MW, Horgan GW y Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36.

Proudfoot N. 2004. New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16: 272-278.

Reece KS, McElroy D y Wu R. 1990. Genomic nucleotide sequence of four rice (*Oryza sativa*) actin genes. *Plant Mol Biol* 14: 621-624.

Saitou N y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Sambrook J y Russell DW. 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc* 2006(1). pii: pdb.prot4455.

Schwarzerová K, Vondráková Z, Fischer L, Boříková P, Bellinvia E, Eliášová K, Havelková L, Fišerová J, Vágner M y Opatrný Z. 2010. The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. *BMC Plant Biol* 10: 89.

Shah DM, Hightower RC y Meagher RB. 1983. Genes encoding actin in higher plants: intron positions are highly conserved but the coding sequences are not. *J Mol Appl Genet* 2: 111-126.

Šlajcherová K, Fišerová J, Fischer L y Schwarzerová K. 2012. Multiple actin isotypes in plants: diverse genes for diverse roles? *Front Plant Sci* 3: 226.

Smith LG y Oppenheimer DG. 2005. Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 271-295.

Staiger CJ. 2000. Signalling to the actin cytoskeleton in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 257-288.

Sun HJ, Cui ML, Ma B y Ezura H. 2006. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett* 580: 620-626.

Sun HJ, Kataoka H, Yano M y Ezura H. 2007. Genetically stable expression of functional miraculin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. *Plant Biotechnol J* 5: 768-777.

Tamura K, Nei M y Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11030-11035.

Vaucheret H, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC y Vernhettes S. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16: 651-659.

Velasco R, Zharkikh A, Troglio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Demattè L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F y Viola R. 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* 2: e1326.

Vitolo N, Forcato C, Carpinelli EC, Telatin A, Campagna D, D'Angelo M, Zimbello R, Corso M, Vannozzi A, Bonghi C, Lucchin M y Valle G. 2014. A deep survey of alternative splicing in grape reveals changes in the splicing machinery related to tissue, stress condition and genotype. *BMC Plant Biol* 14: 99.

Weise A, Rodríguez-Franco M, Timm B, Hermann M, Link S, Jost W y Gorr G. 2006. Use of *Physcomitrella patens* actin 5' regions for high transgene expression: importance of 5' introns. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 337-345.

Xiao K, Zhang C, Harrison M y Wang ZY. 2005. Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Mol Breed* 15: 221-231.

Xing A, Moon BP, Mills KM, Falco SC y Li Z. 2010. Revealing frequent alternative polyadenylation and widespread low-level transcription read-through of novel plant transcription terminators. *Plant Biotechnol J* 8: 772-782.

Yang H, Nairn J y Ozias-Akins P. 2003. Transformation of peanut using a modified bacterial mercuric ion reductase gene driven by an actin promoter from *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 160: 945-952.

Yano M, Hirai T, Kato K, Hiwasa-Tanase K, Fukuda N y Ezura H. 2010. Tomato is a suitable material for producing recombinant miraculin protein in genetically stable manner. *Plant Sci* 178: 469-473.

Zhang D, Du Q, Xu B, Zhang Z y Li B. 2010. The actin multigene family in *Populus*: organization, expression and phylogenetic analysis. *Mol Genet Genomics* 284: 105-119.

C₂~Capítulo 2

C₂ 1. Introducción

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una de las especies cultivadas más importantes a nivel mundial, desde un punto de vista económico. Desgraciadamente es susceptible a numerosos patógenos, siendo los de naturaleza fúngica los más importantes, que provocan anualmente importantes pérdidas para los agricultores (Ferreira *et al.*, 2004). Es por ello que el estudio de las rutas y genes implicados en las respuestas defensivas en esta especie ha cobrado un gran interés en los últimos años, teniendo como objetivo el poder poner en marcha programas de mejora y diseñar nuevas estrategias de protección frente a los patógenos.

Los sistemas defensivos de las plantas pueden ser divididos en dos categorías, constitutivos e inducibles (Freeman y Beattie, 2008). Además, pueden ser divididos en mecanismos de defensa estructurales, químicos y bioquímicos. Dentro de las defensas estructurales, una de las más importantes son las paredes celulares, que suponen un obstáculo físico al que los patógenos tienen que hacer frente para poder infectar a las células vegetales.

Las paredes celulares son conglomerados fibrosos ricos en polisacáridos, en los cuales interactúan diversos polímeros para formar estructuras que hacen las funciones de pilar, embebidas en una matriz polisacáridica (Bacic *et al.*, 1988; Fry, 2004). Se dividen en dos tipos, paredes celulares primarias y paredes celulares secundarias. Las primeras son depositadas durante el crecimiento celular y son extensibles. Muchas células, en las partes blandas de las plantas, solo poseen pared celular primaria, este es el caso de las células en empalizada de las hojas y las células del parénquima presentes a lo largo de la planta. Por otra parte, las paredes celulares secundarias son depositadas una vez el crecimiento celular ha cesado, entre la pared celular primaria y la membrana plasmática, y confieren resistencia y rigidez a tipos celulares especializados, como son las fibras y células del xilema (Mohnen *et al.*, 2008). Estas paredes son reforzadas mediante la deposición de ligninas (Hepler *et al.*, 1970; Boerjan *et al.*, 2003), heteropolímeros tridimensionales que resultan del acoplamiento oxidativo de tres monolignoles, los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, en una reacción mediada por lacasas y peroxidasas de clase III (Ros Barceló, 1997). De este modo, las ligninas representan una importante barrera estructural, confiriendo resistencia a las paredes frente a la degradación y penetración de los patógenos (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Vance *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 2007).

Hasta la fecha existen múltiples ejemplos en la bibliografía de peroxidasa implicadas en lignificación. En *Zinnia elegans* Jacq. la peroxidasa ZPO-C es capaz de oxidar tanto al alcohol sinapílico como al coniferílico, y participa en la lignificación de las paredes celulares secundarias de elementos traqueales en diferenciación (Sato *et al.*, 2006). La peroxidasa ATP A2 de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. es capaz de oxidar los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, además la fusión de su promotor a un gen reportero lleva a que este se exprese en los tejidos lignificados de las plantas transgénicas (Østergaard *et al.*, 2000). La peroxidasa PtrPO21 de *Populus trichocarpa* Torr. y A. Gray ex. Hook. es específica del xilema y se localiza unida a las paredes celulares, a mayores, líneas transgénicas en que la expresión de *PtrPO21* se ha reducido muestran una disminución de alrededor del 20 % en el contenido en ligninas (Lin *et al.*, 2016). Por último, la peroxidasa de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) TP60 también parece estar relacionada con la lignificación, así, cuando la expresión de su gen es reducida empleando construcciones antisentido en tabaco, las líneas transgénicas muestran una reducción en el contenido de ligninas de hasta un 40-50 % respecto a las silvestres, además, los transformantes muestran alteraciones en el desarrollo del aparato vascular (Blee *et al.*, 2003).

La caracterización funcional de una peroxidasa concreta es un trabajo complejo por múltiples motivos. Las peroxidasa de clase III pertenecen a una gran familia multigénica, que en arroz (*Oryza sativa* L.) consta de 138 miembros (Passardi *et al.*, 2004), en *Arabidopsis thaliana* de 73 (Welinder *et al.*, 2002), en *Populus trichocarpa* de 93 (Ren *et al.*, 2014), en *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch y Schimp de 43 y en *Selaginella moellendorffii* Hieron de 79 (Weng y Chapple, 2010). A esto hay que sumar el alto número de isoenzimas, que pueden generarse a partir del mismo gen mediante modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales (Welinder *et al.*, 2002), además de su baja especificidad de sustrato *in vitro* (Hiraga *et al.*, 2001) y sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo e hidroxílico) (Passardi *et al.*, 2005). Por ello, en numerosas ocasiones la caracterización funcional de una peroxidasa resulta del sumatorio de datos obtenidos mediante diferentes aproximaciones: análisis de secuencias con herramientas bioinformáticas (Herrero *et al.*, 2013; Herrero *et al.*, 2014); análisis de datos de transcriptómica y proteómica (Delaunoy *et al.*, 2013; Leng *et al.*, 2015); fusión con proteínas fluorescentes para conocer su localización subcelular (Costa *et al.*, 2008; Cosio *et al.*, 2017); purificación de la proteína y estudios enzimáticos (Martínez-Cortés *et al.*, 2012; Gabaldón *et al.*, 2005); estudio de

mutantes en los que su función está anulada (**Fernández-Pérez et al., 2015; Herrero et al., 2013**) o de plantas transgénicas en que se ha sobreexpresado el gen que codifica para dicha enzima (**Raggi et al., 2015; Jin et al., 2011**).

El objetivo de este capítulo es la identificación y caracterización funcional de una peroxidasa de *Vitis vinifera* L. var. Albariño, implicada en la síntesis de ligninas. Con la finalidad de que en un futuro pueda constituir una diana a tener en cuenta en la obtención de líneas de vid transgénicas resistentes a patógenos.

En el caso concreto de la vid, la caracterización de nuevas peroxidases presenta la ventaja de que el genoma de esta especie está secuenciado (**Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007; Di Genova et al., 2014**) y sus genes anotados (**Grimplet et al., 2012**). En contraposición, se trata de una especie de crecimiento lento y recalcitrante a la transformación (**Vidal et al., 2010**), por este motivo, en numerosas ocasiones, se recurre a la introducción del gen a caracterizar en especies de crecimiento rápido y fácil manejo, como son *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* Domin y *Arabidopsis thaliana* (**Schmidlin et al., 2008; Mzid et al., 2007; Liu et al., 2011**).

En este capítulo se ha seleccionado el gen VIT_07s0129g00360 de vid (*Vitis vinifera* L.) (anotado como gen de la peroxidasa 73) por su posible implicación en procesos de lignificación, atendiendo a rasgos de la proteína para la que codifica. Además, se ha producido dicha proteína en plantas de *Nicotiana benthamiana* para posteriormente purificarla, y mediante ensayos enzimáticos determinar si es capaz de oxidar monolignoles. En un último paso, se han generado líneas de tabaco transgénicas que expresan la región codificante de este gen, a fin de completar la caracterización de su proteína.

C₂ 2. Objetivos

Identificación de un gen de *Vitis vinifera* que codifique para una peroxidasa de clase III implicada en procesos de lignificación, y clonación de su región codificante.

Expresión heteróloga de la región clonada, para posteriormente purificar la proteína y llevar a cabo ensayos de actividad enzimática, que permitan conocer si es capaz de oxidar a los sustratos de la lignificación.

Generación de transformantes que produzcan la proteína de fusión GFP-peroxidasa, para así poder conocer la localización subcelular de la peroxidasa codificada por el gen seleccionado.

Obtención de líneas de tabaco transgénicas que expresen de forma estable la región codificante del gen de vid, permitiendo completar el estudio de la función de la peroxidasa.

C₂ 3. Materiales y métodos

C₂ 3.1. Análisis informáticos

C₂ 3.1.1 Cálculo teórico del punto isoeléctrico y peso molecular

Los cálculos teóricos del punto isoeléctrico y peso molecular de la peroxidasa de vid se realizaron mediante la herramienta *online* del portal de recursos bioinformáticos ExPASy del SIB (Swiss Institute of Bioinformatics). A esta herramienta se accede en el link http://web.expasy.org/compute_pi/.

C₂ 3.1.2 Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de distintas peroxidosas

Todas las secuencias empleadas en el alineamiento se tomaron del NCBI (National Center for Biotechnology Information), y fueron las siguientes: peroxidasa 73 de vid (VviPrx73) (NCBI Reference Sequence: XP_002284278.1), peroxidasa de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (GenBank: AAA65636.1), peroxidasa de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) (GenBank: BAA94962.1), peroxidasa de álamo blanco (*Populus alba* L.) (GenBank: BAE16616.1), peroxidasa de píceas común (*Picea abies* L. (Karst.)) (GenBank: CAH10840.1), peroxidasa de *Zinnia elegans* (GenBank: CAI54302.1), peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey. y Scherb.) (UniProtKB/Swiss-Prot: P80679.1) y peroxidasa de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: CAA68212.1).

El alineamiento se realizó por el método de ClustalW, utilizando el programa informático MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

La imagen del alineamiento se ha obtenido mediante el programa Jalview (<http://www.jalview.org/>).

C₂ 3.1.3 Predicción de motivos en la secuencia aminoacídica de VviPrx73

La predicción de motivos en la secuencia aminoacídica de VviPrx73 se realizó mediante la herramienta *online* PROSITE, del portal de recursos bioinformáticos ExPASy del SIB. A esta herramienta se accede en el link <http://prosite.expasy.org/>. También se empleó la herramienta NetNGlyc (Gupta *et al.*, 2004) de la plataforma *online* del CBS (Center for Biological Sequence Analysis) de la Universidad Técnica de Dinamarca (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

C₂ 3.1.4 Predicción de la localización subcelular de VviPrx73

La predicción de la localización subcelular de VviPrx73, y de la presencia de secuencias que participen en la compartimentalización de esta proteína, se llevó a cabo mediante las herramientas TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 1997) y SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011), de la plataforma *online* del CBS, de la Universidad Técnica de Dinamarca.

C₂ 3.2. Construcción de los plásmidos

C₂ 3.2.1 Clonación de la región codificante del gen de la peroxidasa 73 de vid (*VviPrx73*)

El primer paso en la clonación de la secuencia que codifica para VviPrx73 consistió en la extracción de ARN de plántulas *in vitro* de *Vitis vinifera* L. var. Albariño. Estas fueron cultivadas en medio CP10 (2,2 g/l medio Chée y Pool (Chée y Pool, 1987) (Duchefa Biochemie), 10 g/l sacarosa, 5,6 g/l Plant Agar (Duchefa Biochemie), 1 g/l carbón activo) (pH=5,95) y bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 20 °C.

La extracción del ARN de estas plántulas se llevó a cabo mediante el kit RNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo que propone la casa comercial con diversas modificaciones, tal y como se describe en el apartado A 4. de los Anexos.

El ARN extraído se cuantificó con un Pico100 (Picodrop[™]), los datos así obtenidos y el análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % nos permitieron verificar su calidad.

A partir de 400 ng de este ARN se sintetizó ADNc utilizando el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), usando como cebadores hexámeros aleatorios y siguiendo las indicaciones de la casa comercial. *A lo largo de este trabajo, todos los pasos realizados mediante el empleo de kits comerciales se realizaron siguiendo el protocolo que adjunta la casa comercial, a no ser que en el texto se indique lo contrario.*

La amplificación, mediante PCR, de la región codificante de *VviPrx73*, se llevó a cabo usando como molde 5 µl del ADNc obtenido y como enzima la Pfu ADN Polimerasa (Thermo Fisher Scientific). Los cebadores empleados (indicados a continuación) fueron

diseñados manualmente a partir de la secuencia de este gen (VIT_07s0129g00360) recogida en la base de datos del genoma de la vid del CRIBI Biotechnology Center (Universidad de Padua) (Vitulo *et al.*, 2014) (<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>). Cada cebador incluye la secuencia diana de una enzima de restricción. *Las bases marcadas en negrita en las secuencias de los cebadores corresponden a dianas de enzimas de restricción.*

5'-GAGAG**TCG**ACATGGGTCGATTCCCTCTTCTCG-3' SalI

5'-GAGACCC**GGG**GCTAATTAACACAGAACAATCACGGCGG-3' SmaI

Las condiciones bajo las que se realizó la PCR son las detalladas en la **Tabla C₂ 1**.

Para controlar la expresión de la secuencia que codifica para VviPrx73 se optó por el promotor (PVviACT7) y el terminador (TVviACT7) del gen de la actina 7 de vid, mencionados en el Capítulo 1. Estas secuencias reguladoras se aislaron a partir de ADN genómico de plantas *in vitro* de Albariño, tal y como se comentó en el apartado C₁ 3.2.2 del Capítulo 1, con la única diferencia de que los cebadores empleados en este caso (cuyas secuencias se indican a continuación) incluían las dianas para otras enzimas de restricción.

PVviACT7

5'-GAGAG**GTAC**CTGGCTGAGCCGAGCGGAGTTAT-3' KpnI

5'-GAGAG**TCG**ACCCTTTTATTACCTGCATGAGAAATATGAAGTCAGGGG-3' SalI

TVviACT7

5'-GAGACCC**GGG**AATACAAGTGCTTTGATGGTGAG-3' SmaI

5'-GAGAG**CATG**CCGGTTTACGGTTTTTACAATGCTTTAACA-3' SphI

Tabla C₂ 1. Condiciones de la PCR destinada a la amplificación de la región codificante de VviPrx73.

Mezcla de PCR		Programa de PCR			
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos	
Tampón Pfu 10X con MgSO ₄	2,5 µl	95	3 min	1	
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	95	30 s		
Cebador <i>forward</i>	0,4 µM cf	57	30 s	25	
Cebador <i>reverse</i>	0,4 µM cf	72	2 min 30 s		
ADNc molde	5 µl	72	10 min	1	
Pfu ADN Polimerasa	1,875 U				
Agua MilliQ	Hasta 25 µl				
Volumen total	25 µl				

cf: concentración final

C₂-Capítulo 2

Una vez aisladas mediante PCR todas estas secuencias, se purificaron utilizando el kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) y se digirieron con las dos enzimas de restricción cuyas dianas se habían incorporado en cada uno de sus extremos. Las enzimas empleadas fueron las FastDigest (Thermo Fisher Scientific) y las digestiones se realizaron de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial. *Todas las digestiones con enzimas de restricción realizadas a lo largo de este trabajo se llevaron a cabo con enzimas FastDigest (Thermo Fisher Scientific) y siguiendo el protocolo que indica el fabricante.*

Una vez realizadas las digestiones, los productos de interés se purificaron empleando el kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

El plásmido empleado para la clonación de la región codificante de *VviPrx73* fue el utilizado en el Capítulo 1 que comprende el pGreenII0179 con la construcción PV*viACT7*/TV*viACT7* (Capítulo 1 apartado C₁ 3.2.). Este se digirió con los enzimas KpnI y SphI con el objetivo de retirar la construcción PV*viACT7*/TV*viACT7* del plásmido pGreenII0179. Seguidamente, los productos de la digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, se recortó la banda correspondiente al plásmido pGreenII0179 y se purificó utilizando el kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Los 4 fragmentos de ADN obtenidos hasta el momento (PV*viACT7*, TV*viACT7*, secuencia que codifica para *VviPrx73* y plásmido pGreenII0179 linearizado) se ligaron empleando la T4 ADN Ligasa (Roche), en una reacción donde la cantidad de vector se fijó en 200 ng y el *ratio* molar del vector y de los otros tres fragmentos de ADN fue de 1:1:1:1. La reacción se llevó a cabo según el protocolo proporcionado por la casa comercial, empleando 2 U de enzima y durante toda la noche a 4 °C.

Al tratarse de la ligación de múltiples fragmentos a la par, el producto de la ligación buscado representaba un pequeño porcentaje dentro de la totalidad de los productos resultantes de la ligación, es por ello que se siguió la estrategia descrita por **An et al. (2010)**, que consiste en la detección/aislamiento de ese producto deseado mediante PCR. Para llevar a cabo esta PCR se emplearon 5 µl de la reacción de ligación y la Pfu ADN Polimerasa (Thermo Fisher Scientific). Los cebadores utilizados fueron el cebador *forward* usado en la amplificación de PV*viACT7* (5'-GAGAGGTACCTGGCTGAGCCGAGCGGAGTTAT-3') y el cebador *reverse* empleado en la amplificación de TV*viACT7* (5'-

GAGAGCATGCCGGTTTACGGTTTTTACAATGCTTTAACA-3'). Las condiciones bajo las que se realizó la PCR son las que se detallan en la **Tabla C₂ 2**.

Tabla C₂ 2. Condiciones de la PCR destinada a la amplificación de la construcción PVviACT7-región codificante de VviPrx73-TVviACT7.

Mezcla de PCR		Programa de PCR			
Tampón Pfu 10X con MgSO ₄	2,5 µl	Programa de PCR	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Cebador <i>forward</i>	0,4 µM cf	Desnaturalización	95	30 s	
Cebador <i>reverse</i>	0,4 µM cf	Annealing	55	30 s	25
ADN molde	5 µl reacción de ligación	Extensión	72	8 min 30 s	
Pfu ADN Polimerasa	1,875 U	Extensión final	72	10 min	1
Agua MilliQ	Hasta 25 µl				
Volumen total	25 µl				

cf: concentración final

A continuación, los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se recortó la banda cuyo tamaño correspondía al sumatorio de los tamaños de PVviACT7, TVviACT7 y de la región codificante de VviPrx73. La construcción rescatada se purificó utilizando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) para ser digerida con los enzimas KpnI y SphI y nuevamente purificada mediante el uso del mismo kit.

El *cassette* de expresión purificado, constituido por: PVviACT7, región codificante de VviPrx73 y TVviACT7, se unió mediante una reacción de ligación con el plásmido pGreenII0179 linearizado (obtenido en pasos anteriores de este apartado). La enzima empleada fue la T4 ADN Ligasa (Roche), en una reacción donde la cantidad de vector se fijó en 100 ng y el *ratio* molar del vector y el inserto fue de 1:1. La reacción se llevó a cabo según el protocolo proporcionado por la casa comercial, empleando 2 U de enzima y durante toda la noche a 4 °C.

El producto de la ligación fue empleado para transformar células de *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani y Chalmers, 1919 tal y como se detalla en el apartado A 1. de los Anexos. Las bacterias transformadas se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) (10 g/l tripton, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l cloruro de sodio) con 50 mg/l de kanamicina, durante toda la noche a 37 °C y en agitación, para a partir de este cultivo extraer el plásmido de interés mediante el kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN). De este modo se obtuvo un vector que comprende el plásmido pGreenII0179 con la construcción PVviACT7-región codificante de VviPrx73-TVviACT7 insertada en su sitio de multiclonaje.

C₂ 3.2.2 Clonación de la secuencia que codifica para la proteína de fusión GFP-VviPrx73

La proteína de fusión generada comprende la secuencia de VviPrx73 a la que se incorporó, entre el aminoácido 27 y el aminoácido 28, la secuencia de la proteína GFP (proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* (Murbach y Shearer, 1902)). Esta localización de la secuencia de GFP busca evitar su escisión en el transcurso de la proteína de fusión hasta su localización final, dado que los predictores indican para la secuencia de VviPrx73 la presencia de un péptido señal N-terminal que abarcaría sus 27 primeros aminoácidos. Además, al ser una proteína aún sin caracterizar no se pudo descartar la posible presencia de un propéptido C-terminal, presente en ciertas peroxidasas de clase III.

Para llevar a cabo la clonación, el primer paso consistió en aislar, mediante PCR, las 3 secuencias de ADN que una vez fusionadas codificaron para la proteína de fusión. La unión de estas secuencias se llevó a cabo según el procedimiento que se detalla en el trabajo de **Shevchuk et al. (2004) (Figura C₂ 1)**, lo que implicó que para su aislamiento se utilizaran cebadores que introdujeron en ellas extremos solapantes.

Por una parte, se aisló la secuencia que codifica para la proteína GFP. La versión utilizada fue la *mgfp4* (**Haseloff et al., 1997**), que se aisló mediante PCR utilizando como molde el *cassette* 35S-GFP de la colección de vectores pGreenII (<http://www.pgreen.ac.uk/>). Dicho *cassette*, inicialmente liofilizado, se resuspendió en 10 µl de agua MilliQ. Como molde para la PCR se empleó 1 µl de una dilución 1:100 (en agua MilliQ) del *cassette* resuspendido. Los cebadores empleados se diseñaron manualmente atendiendo a la secuencia recogida en el NCBI (GenBank: U87624.1) y fueron los que se indican a continuación. *Las bases que aparecen en cursiva son las implicadas en generar los extremos solapantes.*

mgfp4

5'-GTATGTGTCTTCCCCGACACCGCATCCGCCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC-3'

5'-GATGTTGGCATAAGTAGTTTTGTTGAGTTGTTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGT-3'

Por otra parte, se aisló la secuencia que codifica para el péptido señal (PS) de VviPrx73 a partir de 1µl de ADNc de plántulas *in vitro* de Albariño (el proceso de obtención del ADNc se detalló en el apartado C₂ 3.2.1). Los cebadores empleados se diseñaron manualmente teniendo en cuenta la secuencia recogida en la base de datos del genoma

de la vid del CRIBI Biotechnology Center (VIT_07s0129g00360), y fueron los que se indican a continuación.

PS

5'-GAGAAAGCTTATGGGTCGATTCCCTCTTCTCG-3'

5'-TCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATGGCGGATGCGGTGTCGG-3'

Por último se aisló la secuencia que codifica para VviPrx73 sin su péptido señal (*VviPrx73^{APS}*), también a partir de 1 µl de ADNc de plántulas *in vitro* de Albariño. Los cebadores utilizados, cuya secuencia se indica a continuación, fueron igualmente diseñados de forma manual atendiendo a la secuencia recogida en la base de datos del genoma de la vid del CRIBI Biotechnology Center.

VviPrx73^{APS}

5'-ATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAACAACCTCAAACAAAACACTACTATGCCAACATC
TG-3'

5'-GAGAGAATTCCTAATTAACACAGAACAAATCACGGCGG-3'

En los 3 casos la polimerasa empleada fue la Pfu ADN Polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y las condiciones bajo las que se realizaron las PCR fueron las detalladas en la **Tabla C₂ 3**.

Tabla C₂ 3. Condiciones de las PCR destinadas a la amplificación de *mgfp4*, de PS y de *VviPrx73^{APS}*.

Mezcla de PCR		Programa de PCR			
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos	
Tampón Pfu 10X con MgSO ₄	2,5 µl	95	3 min	1	Desnaturalización inicial
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	95	30 s		Desnaturalización
Cebador <i>forward</i> *	0,4 µM cf	Tm-5	30 s	25	<i>Annealing</i>
Cebador <i>reverse</i> *	0,4 µM cf	72	2 min		Extensión
ADN molde	**	72	10 min	1	Extensión final
Pfu ADN Polimerasa	1,875 U				
Agua MilliQ	Hasta 25 µl				
Volumen total	25 µl				

cf: concentración final Tm: temperatura de *melting* de los cebadores

* Los cebadores empleados en cada caso fueron los indicados en el texto

** El ADN que se empleó como molde, para cada reacción, fue el indicado en el texto

El producto resultante de cada PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, se cortó la banda correspondiente y se purificó con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Una vez aislados y purificados los tres fragmentos de ADN, se procedió a su fusión empleando, como ya se comentó, el procedimiento que se detalla en el trabajo de Shevchuk *et al.* (2004) (Figura C₂ 1), mediante la realización de dos PCR.

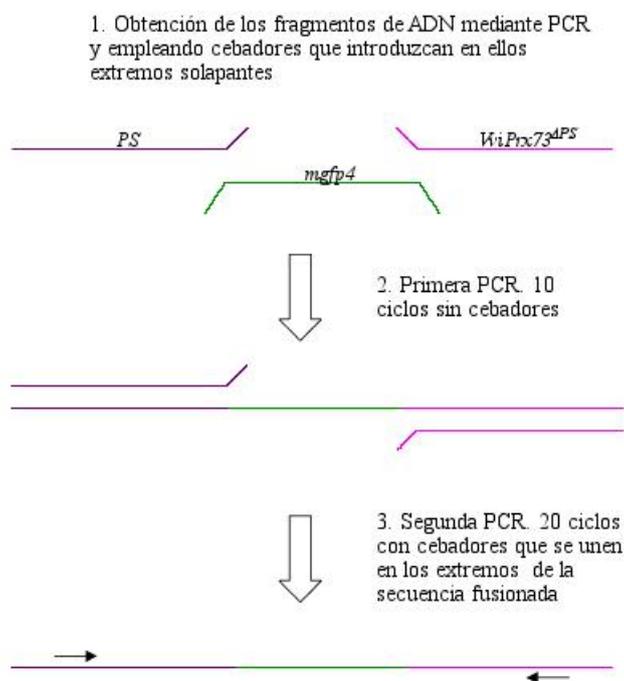


Figura C₂ 1.- Representación esquemática de la fusión de las 3 secuencias de ADN siguiendo el método propuesto por Shevchuk *et al.* (2004). Imagen tomada de Shevchuk *et al.* (2004) y modificada.

PS: secuencia que codifica para el péptido señal de VviPrx73 *VviPrx73^{ΔPS}*: secuencia que codifica para VviPrx73 sin su péptido señal *mgfp4*: secuencia que codifica para la proteína fluorescente mGFP4

La primera de ellas (PCR 1), se realizó tal y como se refleja en la **Tabla C₂ 4**.

Tabla C₂ 4. Condiciones de la PCR 1 dentro del proceso de fusión de secuencias de ADN.

Mezcla de PCR		Programa de PCR			
Tampón Pfu 10X con MgSO ₄	2,5 µl	Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	Desnaturalización	95	30 s	
<i>PS</i>	100 ng	<i>Annealing</i>	50	30 s	10
<i>VviPrx73^{ΔPS}</i>	100 ng	Extensión	72	4 min	
<i>mgfp4</i>	20 ng	Extensión final	72	10 min	1
Pfu ADN Polimerasa	1,875 U				
Agua MilliQ	Hasta 25 µl				
Volumen total	25 µl				

cf: concentración final *PS*: secuencia que codifica para el péptido señal de VviPrx73 *VviPrx73^{ΔPS}*: secuencia que codifica para VviPrx73 sin su péptido señal *mgfp4*: secuencia que codifica para la proteína fluorescente mGFP4

Tras la primera PCR se realizó una segunda (PCR 2) tal y como se detalla en la **Tabla C₂ 5**.

Tabla C₂ 5. Condiciones de la PCR 2 dentro del proceso de fusión de secuencias de ADN.

Mezcla de PCR		Programa de PCR	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Tampón Pfu 10X con MgSO ₄	5 µl	Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	Desnaturalización	95	30 s	
Cebador A	0,2 µM cf	Annealing	50	30 s	20
Cebador B	0,2 µM cf	Extensión	72	4 min	
ADN molde	2 µl reacción de PCR1	Extensión final	72	10 min	1
Pfu ADN Polimerasa	2,5 U				
Agua MilliQ	Hasta 50 µl				
Volumen total	50 µl				

cf: concentración final

Los cebadores empleados en la PCR 2 se indican a continuación.

Cebador A

5'-GAGAAAGCTTATGGGTCGATTCCCTCTTCTCG-3' HindIII

Cebador B

5'-GAGAGAATTCTAATTAACACAGAACAATCACGGCGG-3' EcoRI

El producto de la PCR 2, que correspondía a la secuencia que codifica para la proteína de fusión GFP-VviPrx73, se purificó con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Seguidamente se digirió con los enzimas EcoRI y HindIII, para volver a ser purificado con el mismo kit.

Por otra parte, se digirió el plásmido pJit62 (**Figura C₁ 1** del Capítulo 1) también con los enzimas EcoRI y HindIII, para posteriormente purificarse mediante el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

A continuación el producto de la PCR 2 y el plásmido linearizado se unieron mediante una reacción de ligación empleando la T4 ADN Ligasa (Roche), en ella la cantidad de vector se fijó en 100 ng y el *ratio* molar del vector y el inserto fue de 1:1. Esta reacción se llevó a cabo según el protocolo proporcionado por la casa comercial, empleando 2 U de enzima y durante toda la noche a 4 °C.

El producto de la ligación fue empleado para transformar células de *E. coli* tal y como se detalla en el apartado A 1. de los Anexos. Las bacterias que incorporaron el plásmido fueron cultivadas en medio LB con 100 mg/l de carbenicilina durante toda la noche, a

C₂-Capítulo 2

37 °C y en agitación. A partir de este cultivo bacteriano se extrajo el plásmido de interés empleando el kit QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

El plásmido obtenido, que comprende el pJit62 con la secuencia que codifica para GFP-VviPrx73 insertada en su sitio de multiclonaje, fue digerido con los enzimas KpnI y XhoI. Los productos de la digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, para seguidamente recortar la banda correspondiente a la construcción promotor CaMV35S (promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor)-secuencia que codifica para la proteína de fusión-terminador CaMV (terminador del virus del mosaico de la coliflor) y purificar dicho fragmento utilizando el kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

También se digirió con estas enzimas el plásmido pGreenII0179 (**Figura C₁ 1** del Capítulo 1) y se purificó mediante kit.

A continuación, la construcción con la secuencia que codifica para la proteína de fusión y el plásmido pGreenII0179 linearizado se unieron mediante ligación en presencia de la T4 ADN Ligasa (Roche). Las condiciones de la ligación fueron las mismas que se indicaron anteriormente en este apartado.

El producto de la ligación se empleó para transformar células de *E. coli* (apartado A 1. de los Anexos). Las bacterias que incorporaron el plásmido de interés se cultivaron en medio LB con 50 mg/l de kanamicina, durante toda la noche y a 37 °C en agitación. A partir del cultivo bacteriano y mediante el kit QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN), se extrajo el plásmido de interés, plásmido pGreenII0179 con la secuencia que codifica para la proteína de fusión bajo el control del promotor CaMV35S y el terminador CaMV.

C₂ 3.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez obtenidos los dos plásmidos de interés (pGreenII0179 con la secuencia que codifica para VviPrx73 y pGreenII0179 con la secuencia que codifica para GFP-VviPrx73) se transformó con ellos *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend 1907) Conn 1942 (la cepa empleada fue la AGL1).

Dado que estos dos plásmidos son derivados del pGreenII0179, se realizó una co-transformación de cada uno de ellos junto con el vector pSoup. *El plásmido pSoup es imprescindible para la replicación de los plásmidos pGreenII en Agrobacterium.*

También se transformaron *Agrobacterium* con el plásmido pGreenII0179 junto con el pSoup. Estas bacterias sirvieron para generar los controles en los experimentos de agroinfiltración.

La transformación de *Agrobacterium* se realizó por electroporación de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado A 2. de los Anexos.

C₂ 3.4. Obtención de plantas de tabaco transgénicas

C₂ 3.4.1 Transformación estable de tabaco mediante *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación estable de *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana se llevó a cabo mediante el método de los discos foliares, siguiendo el protocolo de **Clemente (2006)** con ligeras modificaciones, tal y como se detalla en el apartado C₁ 3.4.1 del Capítulo 1. Las *Agrobacterium* empleadas fueron aquellas que portan el plásmido con la secuencia que codifica para VviPrx73 y las que contienen el plásmido con la secuencia que codifica para GFP-VviPrx73.

C₂ 3.4.2 Selección de las plantas transformadas y obtención de líneas transgénicas homocigotas

Las plantas regeneradas tras los experimentos de transformación genética se testaron mediante PCR con el fin de verificar si portaban las secuencias de interés. Para ello se siguió el protocolo de **Kasajima et al. (2004)** con ciertas modificaciones, tal y como se detalla en el apartado C₁ 3.4.2 del Capítulo 1.

En este caso la PCR se llevó a cabo bajo las condiciones detalladas en la **Tabla C₂ 6**, y los cebadores empleados fueron los utilizados en la amplificación de la región codificante de VviPrx73 (apartado C₂ 3.2.1).

Las plantas que resultaron positivas, portando bien la secuencia que codifica para VviPrx73 o bien la secuencia que codifica para GFP-VviPrx73, constituyeron el punto de inicio (T₀) para la obtención de líneas transgénicas homocigotas de la T₂ independientes (procedimiento detallado en el apartado A 3. de los Anexos) y de líneas transgénicas de la T₁ (el proceso de obtención es como el detallado en el apartado A 3. de los Anexos hasta el momento en que se obtienen las plantas de la T₁), respectivamente, que fueron las empleadas en los análisis detallados en este Capítulo 2.

Tabla C₂ 6. Condiciones de la PCR para la selección de las plantas transformadas.

Mezcla de PCR		Programa de PCR			
Tampón 10X DreamTaq	2,5 µl	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos	
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Cebador <i>forward</i>	0,4 µM cf	Desnaturalización	95	30 s	
Cebador <i>reverse</i>	0,4 µM cf	Annealing	57	30 s	35
ADN molde	0,6 µl	Extensión	72	*	
DreamTaq ADN Polimerasa	1,25 U	Extensión final	72	10 min	1
Agua MilliQ	Hasta 25 µl				
Volumen total	25 µl				

cf: concentración final

* El tiempo de extensión fue diferente dependiendo de la secuencia que se intentaba amplificar en cada PCR. En los casos en que se buscaba amplificar la secuencia que codifica para VviPrx73 el tiempo seleccionado era de 1 min y 30 s, mientras que en los casos en que se deseaba amplificar la secuencia que codifica para GFP-VviPrx73 el tiempo de extensión fue de 2 min y 30 s

C₂ 3.5. Agroinfiltración de plantas de *Nicotiana benthamiana*

La agroinfiltración de hojas de plantas adultas de *Nicotiana benthamiana* Domin se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por **Sainsbury et al. (2012)**, con ligeras modificaciones.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* empleadas en la transformación fueron crecidas en tierra desde semillas, bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C, hasta obtener individuos adultos de 1 mes.

Las *Agrobacterium* transformadas con el plásmido que contiene la secuencia que codifica para VviPrx73 fueron crecidas en medio YT (*yeast extract-tryptone*) (5 g/l extracto de levadura, 8 g/l triptona, 2,5 g/l NaCl) (pH=7,0) con 25 mg/l rifampicina y 50 mg/l kanamicina, en agitación y a 28 °C, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ($OD_{600} \geq 2$). Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4000g durante 10 minutos, para descartar a continuación el sobrenadante, quedándonos con el precipitado de bacterias, las cuales se resuspendieron en el volumen de medio MMA (10 mM MES (ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico) (pH=5,6), 10 mM MgCl₂, 100 µM acetosiringona (3',5'-Dimetoxi-4'-hidroxiacetofenona)) con 250 mg/50 ml de D-glucosa necesario para obtener una suspensión con una OD_{600} de aproximadamente 0,4. Esta suspensión bacteriana se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. Pasado ese tiempo, se empleó para infiltrar, mediante el uso de una jeringa, las hojas de las plantas de *N. benthamiana*.

Una vez infiltradas, las plantas de *N. benthamiana* se mantuvieron durante 5 días en una cámara de cultivo bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C.

Todo este proceso se llevó a cabo de igual manera, y en paralelo, empleando las *Agrobacterium* que portaban el plásmido pGreenII0179 para infiltrar plantas de *N. benthamiana*, que fueron usadas como control.

C₂ 3.6. Análisis de los niveles de expresión de la secuencia que codifica para VviPrx73 mediante PCR semicuantitativa

El análisis mediante PCR semicuantitativa se realizó en plantas de tabaco de las líneas homocigotas de la T₂ que portan la región codificante de *VviPrx73*.

Estas plantas fueron crecidas en tierra a partir de semillas, bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C, hasta alcanzar 1 mes de edad.

C₂ 3.6.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Las extracciones de ARN se realizaron con el kit AurumTM Total RNA Mini Kit (BIO RAD) a partir de tejido foliar de 6 plantas de cada línea.

Las muestras de ARN se cuantificaron empleando un NanoDropTM 1000 de Thermo Scientific. Además se verificó su calidad a través de los datos aportados por este aparato y también mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %.

Para comprobar la ausencia de ADN genómico se realizó una PCR en la que se usaron 2 µl de cada una de estas muestras de ARN como molde y como cebadores los empleados en la amplificación de la secuencia que codifica para *VviPrx73* durante su clonación (apartado C₂ 3.2.1). Los demás parámetros empleados en esta PCR coinciden con los que se detallan en la **Tabla C₂ 6**. En ninguno de los casos se produjo amplificación, confirmándose la ausencia de ADN genómico.

Finalmente, a partir de las muestras de ARN obtenidas se sintetizó ADNc empleando el kit iScriptTM Select cDNA Synthesis Kit (BIO RAD). En cada reacción se emplearon 500 ng de ARN y la síntesis se realizó utilizando cebadores Oligo(dT)₂₀.

C₂ 3.6.2 PCR semicuantitativa

Las condiciones de los ensayos de PCR semicuantitativa fueron las que se reflejan en la **Tabla C₂ 7**.

Como cebadores específicos para la región codificante de *VviPrx73* se utilizaron los mismos que en la amplificación de su secuencia durante su clonación (apartado C₂ 3.2.1).

C₂-Capítulo 2

Como gen de referencia se eligió el de la proteína ribosomal L25 (GenBank: L18908.1), y los cebadores empleados fueron los siguientes.

5'-CCCCTCACCACAGAGTCTGC-3'

5'-AAGGGTGTGTTGTCTCAATCTT-3'

Para las reacciones llevadas a cabo con cada pareja de cebadores se utilizó el mismo programa de PCR, que es el especificado en la **Tabla C₂ 7**, modificándose únicamente el número de ciclos, para poder concluir en cada caso la PCR dentro de su fase de amplificación exponencial. Así, en los casos en que se emplearon los cebadores específicos el número de ciclos fue de 25, mientras que en los casos en que se usaron los cebadores para el gen de referencia el número de ciclos fue de 30.

Tabla C₂ 7. Condiciones de los ensayos de PCR semicuantitativa.

Mezcla de PCR		Programa de PCR	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Tampón 10X DreamTaq	2,5 µl	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	Desnaturalización	95	30 s	
Cebador <i>forward</i>	0,4 µM cf	<i>Annealing</i>	57	30 s	*
Cebador <i>reverse</i>	0,4 µM cf	Extensión	72	1 min	
ADNc molde	0,5 µl	Extensión final	72	10 min	1
DreamTaq ADN Polimerasa	1,25 U				
Agua MilliQ	Hasta 25 µl				
Volumen total	25 µl				

cf: concentración final

* En el caso de las reacciones con los cebadores específicos el número de ciclos fue de 25, y en las que se emplearon los cebadores para el gen de referencia de 30

Los productos de las reacciones de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa.

En el caso de las reacciones en que se habían empleado los cebadores específicos, la electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1 % y el tampón empleado para la preparación del gel y desarrollo de la electroforesis fue el tampón TAE (Tris-acetato-EDTA) (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)). La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora aplicando un voltaje de 100 V.

En el caso de las reacciones en que se utilizaron los cebadores para el gen de referencia, la electroforesis fue realizada en un gel de agarosa al 3 % y el tampón empleado para la preparación del gel y desarrollo de la electroforesis fue el tampón litio-ácido bórico (10

mM hidróxido de litio monohidrato, 29,11 mM ácido bórico) (pH=8,2). La electroforesis se desarrolló durante 35 minutos aplicando un voltaje de 120 V.

Dado que durante la preparación de los geles se les había añadido GreenSafe Premium (nzytech), las bandas de ADN pudieron ser visualizadas mediante su exposición a luz ultravioleta.

C₂ 3.7. Extracción de proteínas de hojas de *Nicotiana benthamiana* y purificación de VviPrx73

C₂ 3.7.1 Extracción de proteínas de hojas de *Nicotiana benthamiana*

La extracción de las proteínas totales de las hojas de las plantas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas se llevó a cabo 5 días tras la agroinfiltración.

El material vegetal fue homogeneizado en un mortero usando como tampón de extracción Tris-HCl 50 mM (pH=7,5), EDTA 1 mM y KCl 1 M en una proporción 1:2 (p/v). En el momento de la homogeneización se le añadieron a la mezcla 0,05 g de PVPP (poli(vinilpolipirrolidona)) por gramo de peso fresco. Todo el proceso se realizó sobre hielo.

El homogeneizado se centrifugó durante 40 minutos a 15000g y a 4 °C. Tras este tiempo se recogió el sobrenadante y se descartó el precipitado. Se repitió la centrifugación, descartando nuevamente el precipitado. El sobrenadante rescatado de la última centrifugación se sometió a diálisis durante 24 horas en tampón fosfato 100 mM (pH=7,5), 100 mM NaCl.

C₂ 3.7.2 Purificación de VviPrx73 mediante cromatografía de intercambio catiónico

Previa filtración por 0,45 µm, los extractos de proteínas de plantas control y de plantas productoras de VviPrx73 fueron diluidos con tampón fosfato 100 mM (pH=7,5), para lograr una concentración final de NaCl de 25 mM.

A continuación, cada muestra fue cargada en una columna HiTrap SP HP de 5 ml (GE Healthcare) para cromatografía de intercambio catiónico. Las cromatografías se llevaron a cabo utilizando un sistema ÄKTAprime (GE Healthcare). Para la elución de las proteínas se estableció un gradiente lineal de concentraciones de NaCl, que iba de 25 mM a 1 M, a través de la mezcla de diferentes volúmenes de tampón fosfato 100 mM

C₂-Capítulo 2

(pH=7,5) 25 mM NaCl y tampón fosfato 100 mM (pH=7,5) 1M NaCl. Las fracciones eluidas que se recogieron tras cada cromatografía se juntaron en dos viales (uno correspondiente a las fracciones rescatadas tras la cromatografía de la muestra control y otro correspondiente a las fracciones rescatadas tras la cromatografía de la muestra con VviPrx73) y se concentraron utilizando columnas Amicon Ultra-15 (con membrana PLTK Ultracel-PL y límite de peso molecular nominal de 30 kDa) (Merck Millipore) realizando sucesivas centrifugaciones a 1600g y 4 °C, hasta conseguir que tuviesen un volumen en torno a los 1800 µl. Finalmente, se redujo el contenido en sales de las muestras dializándolas en 3 litros de tampón fosfato 100 mM (pH=7,5), 100 mM NaCl, durante 48 horas.

C₂ 3.8. Extracción de proteínas del apoplasto de *Nicotiana tabacum*

Las proteínas apoplásticas se extrajeron de tallos de plantas transgénicas (y control) de *Nicotiana tabacum*. Estas plantas fueron cultivadas en tierra desde semillas, bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C, hasta alcanzar los 2 meses de edad. *En el momento en que se tomaron las muestras para las extracciones todas las plantas se encontraban en el mismo estado de desarrollo, plantas adultas en el momento del inicio de la floración.*

Los tallos de las plantas de tabaco se cortaron en trozos de en torno a 0,5 cm de longitud y se lavaron con abundante agua destilada. Posteriormente se infiltraron con tampón Tris-acetato 50 mM (pH=5,0) con 1M KCl a 4 °C mediante la aplicación de vacío y hasta el momento en que se observó que todos los trozos de tallo estaban completamente sumergidos en el fondo del recipiente. Las secciones infiltradas se escurrieron y se depositaron en una jeringa dentro de un tubo de centrifuga, para ser centrifugadas a 500g durante 5-10 minutos a 4 °C. La fracción proteica obtenida se dializó durante aproximadamente 24 horas en tampón Tris-acetato 50 mM (pH=5,0).

C₂ 3.9. Determinación de la cantidad total de proteínas

La determinación de la cantidad total de proteínas se llevó a cabo utilizando el método de **Bradford (1976)**. Para ello se usó reactivo de Bradford comercial (BIO RAD) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Como proteína estándar para realizar la recta patrón se empleó la seroalbúmina bovina.

C₂ 3.10. Determinación de la actividad peroxidasa frente a diferentes sustratos y estudio del efecto de inhibidores sobre esta

C₂ 3.10.1 Determinación de la actividad peroxidasa frente a diferentes sustratos

La actividad peroxidasa de las distintas muestras se determinó a 25 °C en un espectrofotómetro Helios γ (Thermo Electron Corporation), usando un medio de reacción que contenía tampón Tris-acetato 50 mM (pH=5,0), H₂O₂ 0,5 mM y el donador de electrones 4-MN (4-metoxi- α -naftol) 1 mM ($\epsilon_{595}=21,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

También se midió la actividad peroxidasa, bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente, pero utilizando en lugar del donador de electrones 4-MN los precursores de las ligninas 0,1 mM alcohol coniferílico ($\epsilon_{262}=9,75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 0,1 mM alcohol sinapílico ($\epsilon_{271}=4,14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (**Barceló y Pomar, 2001**).

C₂ 3.10.2 Estudio del efecto de los inhibidores ácido ferúlico y tropolona sobre las actividades sinapil- y coniferil- peroxidasa

Para descartar que las reacciones de oxidación se estuviesen produciendo de forma espontánea o por acción de otras enzimas distintas a peroxidosas, se estudió el efecto de inhibidores sobre las actividades sinapil- y coniferil- peroxidasa, añadiéndolos al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición del sustrato (alcohol sinapílico o alcohol coniferílico, respectivamente). Los inhibidores utilizados fueron el ácido ferúlico (1mM) y la tropolona (1mM).

C₂ 3.10.3 Análisis estadístico de las medidas de actividad peroxidasa en *N. tabacum*

El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS y consistió en un análisis de la varianza (ANOVA), seleccionando los tests de Dunnett y Tukey en los casos en que las varianzas eran homogéneas y donde las varianzas no eran homogéneas el test de Games-Howell.

Para todos los análisis se tomó que las diferencias significativas vendrían indicadas por un valor de $P < 0,05$.

C₂ 3.11. Obtención del patrón de proteínas apoplásticas mediante electroforesis disociante SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

C₂ 3.11.1 Desarrollo de la electroforesis disociante SDS-PAGE

El patrón de proteínas apoplásticas de tallos de tabaco se obtuvo mediante electroforesis disociante SDS-PAGE de los extractos proteicos mencionados en el apartado C₂ 3.8. Esta se realizó según el protocolo descrito por **Laemmli (1970)** con ligeras modificaciones.

Para ello, se preparó un gel separador compuesto por tampón Tris-HCl 1,5 M (pH=8,8), acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 10 %, SDS (sodio dodecilsulfato) al 0,1 %, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina) al 0,15 % y persulfato amónico al 0,05 %. Y un gel concentrador, resultado de la mezcla de tampón Tris-HCl 0,5 M (pH=6,8), acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 4 %, SDS al 0,1 %, TEMED al 0,2 % y persulfato amónico al 0,08 %.

Antes de ser cargadas en el gel, las proteínas se desnaturalizaron por calentamiento en un baño en ebullición durante 10 minutos, en presencia de tampón Tris-HCl 0,5 M (pH=6,8), glicerol 8 %, SDS 0,7 % y azul de bromofenol 0,01 %.

Finalmente, la electroforesis se llevó a cabo en una cubeta MiniProtean 3 (BIO RAD) usando un tampón compuesto por glicina 192 mM, Tris 25 mM (pH=8,3), con SDS al 0,1 %. El voltaje aplicado, con una fuente de alimentación BIO RAD Power-Pac 1000, fue de 200 V durante 45 minutos.

C₂ 3.11.2 Tinción de los geles con plata

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

sódico al 2,5 % y formaldehído al 0,0074 %. Finalmente, la reacción se detuvo con una solución que contenía EDTA-Na₂ al 1,46 %. Los geles se conservaron en agua destilada hasta que se fotografiaron.

C₂ 3.11.3 Tinción de los geles con azul de Coomassie

Tras la electroforesis, las proteínas se revelaron sumergiendo el gel en una solución de azul de Coomassie G-250 al 0,1 % en metanol al 50 % (en agua MilliQ) e incubándolo a temperatura ambiente y en agitación durante 1 hora.

Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de tinción y se procedió al desteñido del gel en una solución de metanol al 40 % (en agua MilliQ), que se cambió periódicamente hasta el momento en que se observaron claramente las bandas de proteínas en azul sobre el fondo del gel sin coloración. Este paso, al igual que el de tinción, se realizó a temperatura ambiente y en agitación. Una vez concluido el proceso, el gel se conservó en agua MilliQ.

C₂ 3.12. Obtención del patrón de isoenzimas de peroxidasa mediante isoelectroenfoque

C₂ 3.12.1 Desarrollo del isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque se llevó a cabo en un sistema Multiphor II de Pharmacia-Biotech, manteniendo la temperatura constante a 4 °C, mediante un circuito cerrado de refrigeración conectado a un estabilizador de temperatura Multitemp III de Amersham Pharmacia Biotech.

El gel empleado, que se componía de acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 6,5 %, anfolinas Pharmalyte (GE Healthcare) de rango pH=3-10 al 2 %, glicerol al 5 % y persulfato amónico al 0,06 %, se colocó sobre la placa de porcelana del Multiphor II, depositándose entre el vidrio y la placa unas gotas de agua destilada para obtener una temperatura homogénea en toda la superficie del gel. Seguidamente, se colocaron en cada extremo del gel unas bandas de isoelectroenfoque de Pharmacia empapadas en soluciones electrolíticas, NaOH 1 M para la banda del cátodo y H₃PO₄ 1 M para la banda del ánodo.

Por último, para cargar las muestras se utilizaron papeles de aplicación de Pharmacia de 5x2 mm, colocados sobre el gel a lo largo de la línea media entre la banda del cátodo y la del ánodo.

Las condiciones del isoelectroenfoque para un gel de 8 cm de longitud fueron de 1500 V, 16 mA y 10 W durante 50 minutos.

C₂ 3.12.2 Revelado de las isoenzimas de peroxidasa

El revelado de las isoenzimas de peroxidasa se logró mediante la incubación del gel en un medio de tinción con 4-MN 1 mM y H₂O₂ 0,33 mM en tampón Tris-acetato 50 mM (pH=5,0), durante 10 minutos a 25 °C y en agitación. Pasado este tiempo, el gel se transfirió a un recipiente con agua destilada para su conservación hasta el momento de tomar las fotografías.

C₂ 3.13. Verificación de la presencia de VviPrx73 en el apoplasto de las líneas transgénicas mediante PMF (*peptide mass fingerprinting*)

Tras separar las proteínas del extracto apoplástico de tallos de tabaco mediante electroforesis disociante SDS-PAGE (apartado C₂ 3.11.1) y teñir el gel con azul de Coomassie (apartado C₂ 3.11.3), se recortó la banda en la que se sospechaba que estaba VviPrx73 y se envió a la Unidad de Espectrometría de Masas e Proteómica de la Universidad de Santiago de Compostela para verificar la presencia de dicha proteína mediante PMF.

El primer paso del análisis consistió en la digestión con tripsina de las proteínas contenidas en la banda, incluyendo los pasos de reducción y alquilación.

La matriz empleada en la preparación de las muestras para ser analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) fue la 3-HCCA (ácido α -ciano-3-hidroxicinámico). La calibración del espectrómetro se llevó a cabo usando el Peptide Calibration Standard II (Bruker).

La adquisición del espectro de masas de los péptidos se realizó empleando un espectrómetro de masas Ultraflex III Tof/Tof (Bruker) en modo reflector con ionización positiva y en un rango de masas (m/z) de 500-5000, controlado por el *software* FlexControl (Bruker). El instrumento estaba provisto de un láser Smartbeam1 y las condiciones bajo las que se realizaron los ensayos fueron las siguientes: fuente de iones

1 a 25 kV, fuente de iones 2 a 22 kV, voltaje de la lente a 9,5 kV, voltaje del reflector a 26,30 kV, *pulsed ion extraction time* 10 ns, *matrix suppression mass cutoff* 450 Da.

El procesamiento y anotación del espectro se realizó mediante el *software* FlexAnalysis (Bruker).

Los espectros de masas obtenidos se compararon con la base de datos NCBIprot, usando la herramienta Mascot, restringiendo la búsqueda a *Vitis vinifera*. Los parámetros de búsqueda aplicados fueron los siguientes: se indicó el uso del enzima tripsina para la obtención de los fragmentos; como modificaciones variables se indicó oxidación (M) y como modificaciones fijas carbamidometil (C); datos introducidos monoisotópicos; tolerancia para los valores de masa de los péptidos de 100,0 ppm; se permitió 1 sitio de ruptura perdido y el umbral de significancia seleccionado fue de $P < 0,05$. Además se consideró que la identificación de una proteína era aceptada con una puntuación de Mascot $> 100,0$.

C₂ 3.14. Estudio de la localización subcelular de la proteína de fusión GFP-VviPrx73

C₂ 3.14.1 Preparación de las plántulas que producen la proteína de fusión para su visualización al microscopio confocal

Las semillas de tabaco transgénicas (T₁) que portan la secuencia que codifica para la proteína de fusión se esterilizaron mediante su inmersión en una solución de lejía comercial al 5 % con unas gotas de Tween-20. A continuación se sembraron en placas Petri con medio 0,5X MS (Murashige y Skoog) (Murashige y Skoog, 1962) con 20 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar (pH=5,8), suplementado con 50 mg/l de higromicina, y se cultivaron en oscuridad, bajo unas condiciones de 16 horas a 24 °C y 8 horas a 20 °C, hasta pasados 5 días tras el momento de su germinación. Transcurrido ese tiempo las plántulas fueron transferidas a placas Petri con el mismo medio de cultivo pero con pH=8,1, en el que se cultivaron durante 2 días (también en oscuridad y bajo las mismas condiciones), tras los cuales se realizaron las visualizaciones y se tomaron las imágenes.

C₂ 3.14.2 Tratamiento con manitol para provocar la plasmólisis de las células de las plántulas de tabaco

Las células de las plántulas de tabaco se plasmolizaron mediante la inmersión de estas en una solución de manitol saturada durante 3 horas.

C₂ 3.14.3 Visualización de la localización subcelular de la proteína de fusión al microscopio confocal

La visualización de los tejidos de las plántulas de tabaco se llevó a cabo en un microscopio láser confocal Leica AOBS-SP5X de LEICA Microsystems Heidelberg GmbH perteneciente a la Unidad de Microscopía Electrónica e Confocal e de Especialidades Biológicas de la Universidad de Santiago de Compostela.

El láser de excitación empleado fue un láser blanco y la longitud de onda de excitación fue 489 nm. La banda de emisión seleccionada fue de 505 nm-600 nm, además, simultáneamente se recogió la imagen de luz transmitida en campo claro. El objetivo empleado fue el HCX PL APO CS 20.0x0.70 DRY UV y el *software* que se utilizó el Leica Confocal Software (LAS).

La superposición de las imágenes de fluorescencia y de luz transmitida en campo claro se realizó con el programa informático Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

También se visualizaron al microscopio confocal plántulas de tabaco transgénicas que poseían la región codificante de *VviPrx73*. Estas se crecieron a partir de semillas tal y como se comentó en el apartado C₂ 3.14.1 y fueron utilizadas como control, para descartar que la fluorescencia observada en los tejidos de las plántulas que producen la proteína de fusión fuese debida a autofluorescencia de las propias células.

C₂ 4. Resultados y discusión

C₂ 4.1. Validación de la anotación de VIT_07s0129g00360 como gen que codifica para una peroxidasa de clase III

El gen de vid seleccionado para la realización de este trabajo fue el identificado con el código VIT_07s0129g00360 en la base de datos del genoma de la vid del CRIBI Biotechnology Center, y anotado como gen de la peroxidasa 73 (**Grimplet *et al.*, 2012**). Teniendo en cuenta los datos de expresión del atlas hecho con los microarrays de NimbleGen en *Vitis vinifera* var. Corvina (**Fasoli *et al.*, 2012**), que recoge valores de expresión de los genes de la vid en los diferentes órganos y estados del desarrollo, VIT_07s0129g00360 muestra sus niveles máximos de expresión en plántulas y raíces, mientras que los niveles mínimos de expresión se observan en semillas durante el envero.

Una vez revisados los datos disponibles sobre este gen, se procedió a analizar las características de la secuencia aminoacídica para la que codifica, a fin de verificar que realmente se trata del gen de una peroxidasa de clase III y de intentar obtener información acerca de la función de esta proteína.

VIT_07s0129g00360 codifica para una proteína de 331 aminoácidos, lo que concuerda con el rango de tamaños normal de las peroxidasas de clase III. El punto isoelectrico (pI) teórico de esta proteína es de 8,78, de modo que se trataría de una peroxidasa básica, ya que las peroxidasas vegetales de clase III se clasifican en ácidas (punto isoelectrico inferior a 7,0) y básicas (punto isoelectrico superior a 7,0). Este dato podría aportar información acerca de sus posibles sustratos, y es que tanto peroxidasas básicas como ácidas son capaces de oxidar los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, sin embargo, en lo que respecta al alcohol sinapílico las peroxidasas ácidas son generalmente (aunque existen excepciones) consideradas poco eficientes, debido a las dificultades de acomodación de este sustrato en el centro catalítico de dichas enzimas (**Ros Barceló *et al.*, 2004; Barceló *et al.*, 2007**).

A continuación, se alineó la secuencia aminoacídica para la que codifica VIT_07s0129g00360 (supuesta peroxidasa 73) con las secuencias de peroxidasas conocidas, tanto de tipo siringilo (S), que son aquellas que son capaces de oxidar los monómeros siringilo, como de tipo guaiacilo (G), peroxidasas capaces de oxidar monómeros guaiacilo pero incapaces de oxidar eficientemente los monómeros siringilo

(Figura C₂ 2). Mediante este alineamiento se pudo observar que la supuesta peroxidasa 73 presenta regiones conservadas en estas peroxidadas, como son los motivos FHDCFV y VSC (Novo-Uzal *et al.*, 2013) además de unos residuos de cisteína muy característicos de este tipo de enzimas. En cuanto a la presencia de ciertos motivos típicos de peroxidadas de tipo S (Barceló *et al.*, 2007), la proteína de vid solo presenta algunos de ellos, que son la A de la posición 128, la Y de la posición 214 y la K de la posición 309.

Además, el análisis de la secuencia aminoacídica de la supuesta peroxidasa 73, mediante herramientas bioinformáticas, permitió advertir la presencia de un posible péptido señal, típico de proteínas que serán secretadas a apoplasto, así como de secuencias características de peroxidadas de clase III (Figura C₂ 2).

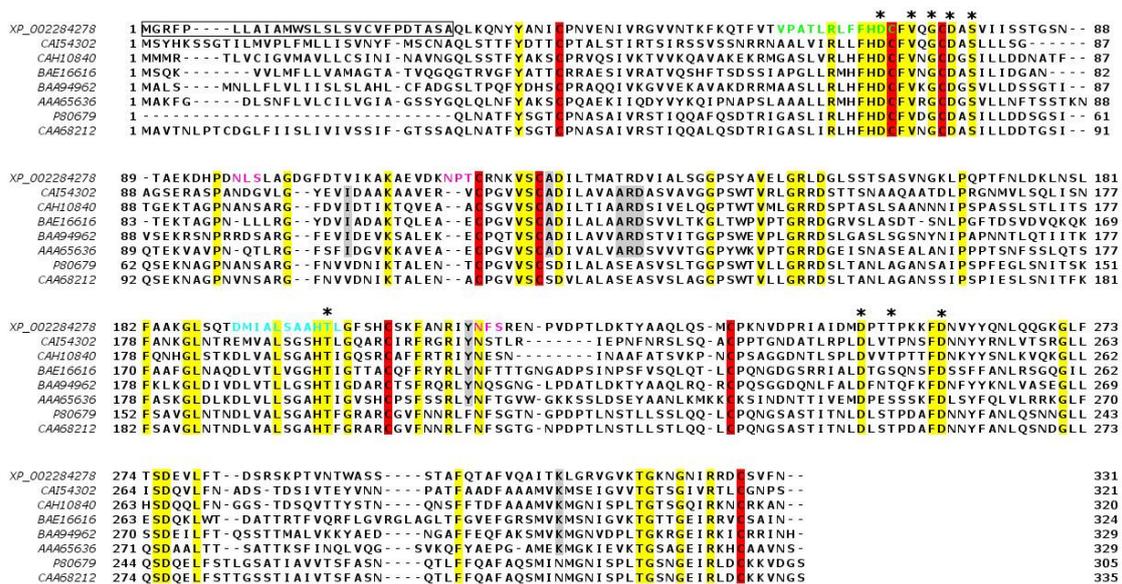


Figura C₂ 2.- Alineamiento, mediante el método de ClustalW, de la secuencia aminoacídica de la supuesta peroxidasa 73 de vid (XP_002284278) con la de 5 peroxidadas tipo siringilo (las peroxidadas de tomate (AAA65636), de espárrago (BAA94962), de álamo blanco (BAE16616), de píceas común (CAH10840) y de *Zinnia elegans* (CAI54302)) y la de 2 peroxidadas tipo guaiacilo (la peroxidasa de rábano picante (P80679) y la peroxidasa de *Arabidopsis thaliana* (CAA68212)). En amarillo se indican regiones altamente conservadas, en rojo cisteínas muy conservadas que intervienen en la formación de puentes disulfuro y en gris motivos típicos de peroxidadas de tipo S. En la secuencia de la proteína de vid se marca con un recuadro negro el péptido señal, con asteriscos sitios de unión a calcio, en letra rosa sitios de N-glicosilación, en letra verde el sitio activo y en letra turquesa el motivo proximal de unión a grupo hemo.

Estos datos apoyan la anotación del gen VIT_07s0129g00360 como gen de una peroxidasa de clase III, la peroxidasa 73 (VviPrx73), de modo que en el texto se hará referencia a él como gen de la peroxidasa 73 de vid (VviPrx73). Además, de ellos se

intuye que pueda tratarse de una peroxidasa participante en lignificación, dada la presencia de motivos conservados en otras peroxidases implicadas en este proceso, y dada la predicción de su localización en el apoplasto. Sin embargo, estos análisis no permiten determinar qué sustratos de la lignificación es capaz de oxidar esta proteína, ya que si bien estamos ante una peroxidasa básica, lo que haría suponer que es capaz de oxidar los grupos siringilo, además de los guaiacilo, en el alineamiento se ha visto que carece de algunos de los motivos típicos de peroxidases de tipo S, como son el motivo ARD en torno a la posición 131 y la I en torno a la posición 106.

C₂ 4.2. Clonación, expresión heteróloga y purificación de VviPrx73 para la realización de ensayos de actividad enzimática

C₂ 4.2.1 Clonación de la secuencia que codifica para VviPrx73

El primer paso para clonar la región codificante de *VviPrx73* fue el diseño de cebadores, teniendo en cuenta la secuencia depositada en la base de datos del genoma de la vid del CRIBI Biotechnology Center (VIT_07s0129g00360). Como molde para amplificar la región de interés se empleó ADNc sintetizado a partir de ARN de plántulas de *Vitis vinifera* L. var. Albariño.

En la clonación se utilizó el plásmido pGreenII0179, en cuyo sitio de multiclonaje se introdujo la construcción compuesta por la secuencia que codifica para VviPrx73, bajo el control del promotor y el terminador del gen de la actina 7 de vid (PVviACT7 y TVviACT7, respectivamente), caracterizados en el Capítulo 1. La elección de estas secuencias fue debida a que, tal y como se detalló en el anterior capítulo, conducen a unos niveles de expresión de los transgenes superiores a los obtenidos empleando el promotor CaMV35S y el terminador CaMV. Además, de las combinaciones de secuencias reguladoras testadas en el Capítulo 1, es la que confiere una mayor estabilidad en los niveles de expresión del gen introducido entre las diferentes líneas transgénicas.

Una vez clonada la región codificante de *VviPrx73*, el plásmido que la alberga fue introducido en *Agrobacterium tumefaciens* para llevar a cabo los experimentos de transformación genética de plantas.

C₂ 4.2.2 Expresión heteróloga y purificación de VviPrx73

Con el objetivo de obtener una cantidad de VviPrx73 suficiente para llevar a cabo ensayos de actividad enzimática *in vitro*, se empleó *Nicotiana benthamiana* como sistema heterólogo para la producción de esta proteína.

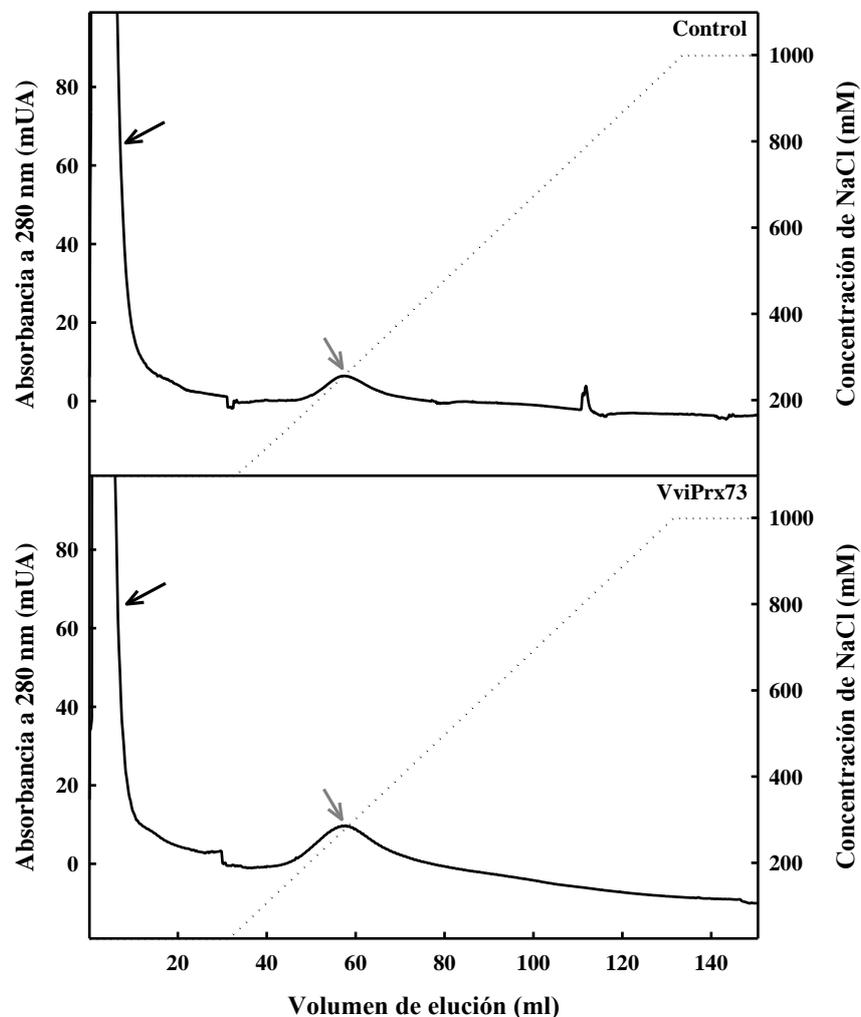


Figura C₂ 3.- Registros durante la cromatografía de intercambio catiónico, realizada para la purificación de VviPrx73 a partir de extractos proteicos de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas. La gráfica de la parte superior (nombrada como control) corresponde a la cromatografía realizada a partir del extracto de proteínas obtenido de las plantas transformadas con el vector vacío. La gráfica de la parte inferior (nombrada como VviPrx73) corresponde a la cromatografía realizada a partir del extracto proteico obtenido de plantas transformadas con el vector que contiene la región codificante de VviPrx73. En las gráficas, la línea continua corresponde a los registros de absorbancia a 280 nm, mientras que la línea punteada hace referencia al gradiente de concentraciones de NaCl que se estableció durante la cromatografía para la elución de las proteínas retenidas en la columna. La flecha negra señala el pico correspondiente a la elución de las proteínas que no se unieron a la columna, mientras que la flecha gris señala el pico correspondiente a la elución de las proteínas que habían quedado retenidas en la columna.

Para ello se transformaron, mediante agroinfiltración, plantas de *N. benthamiana* con el plásmido que porta la secuencia que codifica para VviPrx73 (apartado C₂ 4.2.1). Paralelamente, también se transformaron plantas de *N. benthamiana* con el plásmido pGreenII0179 vacío (sin la secuencia que codifica para VviPrx73), que constituyeron las plantas control.

Pasados 5 días del momento de la agroinfiltración, se realizó una extracción de proteínas totales de las hojas de las plantas transformadas, para luego someter a estas muestras a cromatografía de intercambio catiónico (**Figura C₂ 3**).

Tras la cromatografía de intercambio catiónico se recogieron y juntaron las fracciones de la 8 a la 30, que correspondían al momento de la elución de las proteínas que habían quedado retenidas en la columna. Tanto la muestra de las plantas control como la de las productoras de VviPrx73 se concentraron utilizando columnas con límite de peso molecular de 30 kDa, lo que sirvió para eliminar proteínas de pequeño tamaño. De este modo se consiguió, a partir de las *N. benthamiana* productoras de VviPrx73, una muestra muy enriquecida en esta peroxidasa de vid. En paralelo, a partir de las plantas transformadas con el vector vacío, se obtuvo una muestra casi idéntica a la anterior, con la única diferencia de que en esta VviPrx73 no estaba presente.

C₂ 4.2.3 Ensayos de actividad enzimática frente a sustratos de la lignificación

Las muestras obtenidas en el anterior apartado (C₂ 4.2.2) fueron empleadas para la realización de ensayos de actividad enzimática *in vitro*, que permitieron conocer la capacidad de VviPrx73 para oxidar el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico, sustratos de la lignificación.

La muestra con VviPrx73 muy probablemente contuviera también otras proteínas, siendo realmente una muestra muy enriquecida en VviPrx73, pero no VviPrx73 totalmente pura. Sin embargo, el empleo como control de una muestra obtenida en paralelo, pero a partir del extracto proteico de plantas transformadas con un vector vacío, permitió descartar en las pruebas de actividad enzimática la contribución debida a la posible presencia de otras enzimas.

Los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos aparecen recogidos en la **Tabla C₂ 8**. Como se puede apreciar, la actividad, tanto frente a alcohol coniferílico como frente a alcohol sinapílico, es mucho mayor en el caso de la muestra obtenida a partir de las plantas productoras de VviPrx73. Centrándose en esta muestra, la actividad frente a alcohol coniferílico es muy superior a la actividad frente a alcohol sinapílico. Dado que

la muestra obtenida de las plantas transformadas con la región codificante de *VviPrx73* y la muestra control solo se diferencian en la presencia (en el caso de la primera) de la peroxidasa de vid, estos resultados son indicativos de que estamos ante una peroxidasa capaz de oxidar tanto el alcohol sinapílico como el coniferílico, aunque con una clara preferencia por el segundo.

Tabla C₂ 8. Actividad peroxidasa frente a sustratos de la lignificación.

	Actividad peroxidasa (nkat g ⁻¹ peso fresco)	
	Alcohol coniferílico	Alcohol sinapílico
Vector vacío	0,011 ± 0,001	0,002 ± 0,002
Vector <i>VviPrx73</i>	0,148 ± 0,007	0,030 ± 0,001

Los resultados corresponden a la media ± la desviación estándar obtenida del ensayo por triplicado de cada una de las muestras.

Para demostrar la especificidad de esta reacción y validar que se trata de una oxidación mediada por una peroxidasa, y no de la oxidación espontánea de los sustratos o mediada por otro tipo de enzimas, se calculó para la muestra enriquecida en *VviPrx73* el porcentaje de inhibición de la actividad peroxidasa frente a los alcoholes sinapílico y coniferílico, empleando como inhibidores el ácido ferúlico y la tropolona (**Tabla C₂ 9**). El ácido ferúlico es un eficiente inhibidor competitivo de las peroxidosas, dado que reacciona con el compuesto II de la peroxidasa a una velocidad que llega a ser 10 veces mayor que la mostrada por otros muchos fenoles, tratándose de uno de los mejores sustratos de esta enzima, además, presenta una gran capacidad de acomodarse en el centro activo de la peroxidasa, pudiendo dar lugar a hasta tres modelos distintos de interacción con la enzima (**Henriksen et al., 1999**). El ácido ferúlico es capaz de inhibir la actividad peroxidasa a una concentración de 1 mM (**Pomar Barbeito, 2000**), por otra parte, este compuesto a la concentración de 1 mM no tiene efecto sobre las polifenoloxidasas de tipo lacasa (**Sterjiades et al., 1992; Chabanet et al., 1994; Ranocha et al., 1999**). Tal y como se observa en la **Tabla C₂ 9**, el ácido ferúlico es capaz de inhibir al 100 % la oxidación tanto del alcohol sinapílico como del coniferílico, lo que parece indicar que la oxidación de estos alcoholes no se produjo de forma espontánea ni por la acción de polifenoloxidasas de tipo lacasa.

Sin embargo, el ácido ferúlico es un importante inhibidor de la actividad enzimática de las polifenoloxidasas de tipo catecolasa (**Udagama-Randeniya y Savidge, 1995; Richardson et al., 1997**). Por este motivo, el uso del ácido ferúlico no permite discernir

entre las peroxidasas y las catecolasas, lo que hace necesario el uso de otro inhibidor para distinguir entre estos dos tipos de enzimas, de modo que se empleó también el inhibidor tropolona. La tropolona es un inhibidor selectivo de las actividades de tipo catecol-oxidasa (Chabanet *et al.*, 1994; Udagama-Randeniya y Savidge, 1995), que no tiene efecto conocido sobre las peroxidasas. Como refleja la **Tabla C₂ 9**, la oxidación del alcohol coniferílico no se vio afectada por la tropolona, de modo que se descarta que esta reacción fuese llevada a cabo por catecolasas, así pues, estos datos junto con los obtenidos del empleo del inhibidor ácido ferúlico parecen indicar que la oxidación del alcohol coniferílico se produjo por la acción de peroxidasas. En el caso de la oxidación del alcohol sinapílico, ante la presencia de la tropolona existe una inhibición del 48,53 % de esa actividad, esto parece señalar que en la oxidación de este compuesto podrían estar participando tanto catecolasas como peroxidasas.

Tabla C₂ 9. Porcentaje de inhibición de la actividad peroxidasa por ácido ferúlico y tropolona.

Inhibidor	% Inhibición	
	Alcohol coniferílico	Alcohol sinapílico
Ácido ferúlico	100%	100%
Tropolona	0%	48,53%

Cada % de inhibición se calculó a partir de los datos del ensayo por duplicado de la muestra enriquecida en VviPrx73.

Tal y como indican los ensayos de actividad enzimática frente a alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, y las pruebas con inhibidores, VviPrx73 parece ser capaz de oxidar ambos sustratos, mostrando una preferencia clara por el alcohol coniferílico, dado que los valores de actividad frente al alcohol coniferílico son de $0,148 \pm 0,007$ nkat g⁻¹ peso fresco, mientras que la actividad frente a alcohol sinapílico es de tan solo $0,030 \pm 0,001$ nkat g⁻¹ peso fresco, y parte de ella podría ser debida a catecolasas.

Estos datos son coherentes con los obtenidos anteriormente en este capítulo (apartado C₂ 4.1.), resultado del alineamiento de la secuencia aminoacídica de VviPrx73 con la de peroxidasas de tipo G y de tipo S conocidas. Como ya se mencionó, VviPrx73 posee algunos de los motivos típicos de las peroxidasas de tipo S, pero no todos, quizá esta es la razón por la cual es capaz de oxidar el alcohol sinapílico pero de forma muy poco eficiente, en comparación con su actividad frente al alcohol coniferílico.

C₂ 4.3. Localización subcelular de VviPrx73

El siguiente paso en la caracterización de VviPrx73 fue el de intentar conocer su localización subcelular. Para ello, se construyó una fusión de la secuencia que codifica para esta proteína con la secuencia que codifica para una GFP, en concreto, se empleó la versión *mgfp4* (Haseloff *et al.*, 1997).

Las peroxidasas de clase III son proteínas secretadas fuera de las células o transportadas a las vacuolas (Hiraga *et al.*, 2001). La mayoría de los ARNm de estas peroxidasas codifican un péptido señal, de 19 a 31 residuos, de entrada al retículo endoplasmático, que dirige a la proteína hacia la ruta de secreción. Algunos ARNm también codifican un propéptido carboxi-terminal que puede ser responsable de su deposición en las vacuolas (Welinder *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2008).

Tal y como se comentó en el apartado C₂ 4.1., los programas informáticos empleados para la predicción de la localización subcelular de esta peroxidasa, y de posibles regiones en su secuencia que interviniesen en el tránsito de la proteína hacia su destino, la localizan en apoplasto, y predicen la presencia de un péptido señal que abarcaría los 27 primeros aminoácidos de la proteína. Sin embargo, esto son meras predicciones, y no se puede descartar que VviPrx73 cuente con un propéptido carboxi-terminal. Por este motivo, *mgfp4* se fusionó entre la base 81 y la 82 de la secuencia que codifica para VviPrx73, de modo que la proteína de fusión resultante era la representada en la **Figura C₂ 4.**



Figura C₂ 4.- Proteína de fusión (GFP-VviPrx73) que se compone, desde su extremo N-terminal y por este orden, del péptido señal de VviPrx73 (PS), proteína fluorescente verde (GFP) (la versión empleada fue la mGFP4) y secuencia aminoacídica de VviPrx73 sin el péptido señal (VviPrx73^{APS}), es decir, del aminoácido 28 en adelante.

Con esta construcción se transformaron de forma estable plantas de tabaco, mediante el método de los discos foliares, con el objetivo de conocer la localización subcelular de la proteína de fusión, y así pues de VviPrx73, a través de la observación de los tejidos de estas plantas transgénicas al microscopio confocal.

La fluorescencia de las GFP disminuye en ambientes ácidos (pH<6,0) (Campbell y Choy, 2001), por ello su visualización en apoplasto es dificultosa, hecho que condicionó la forma de proceder.

Como se comentó, se recurrió a la transformación estable de tabaco con la construcción de la proteína de fusión y no a la agroinfiltración, como se hace en la mayoría de los casos. Esto fue debido a que en el trabajo de **Haseloff *et al.* (1997)** detectaron en *Agrobacterium*, transformadas con una construcción de *mgfp4* con el promotor CaMV35S, una leve fluorescencia. Por tanto, dado que se esperaba que la fluorescencia en apoplasto fuese débil, debido a su pH ácido, y que de realizarse la transformación genética mediante agroinfiltración en el momento de las observaciones al microscopio habría *Agrobacterium* transformadas en los espacios intercelulares (misma localización que la predicha para VviPrx73), el empleo de esta técnica podría dar lugar a falsos positivos.

Además, con el fin de incrementar la fluorescencia de la GFP, las plántulas transgénicas en que se realizaron las observaciones fueron cultivadas en un medio a pH=8,1, como indican en su trabajo **Zheng *et al.* (2004)**, asimismo, para evitar una debilitación de la señal fluorescente estas plántulas se cultivaron en oscuridad.

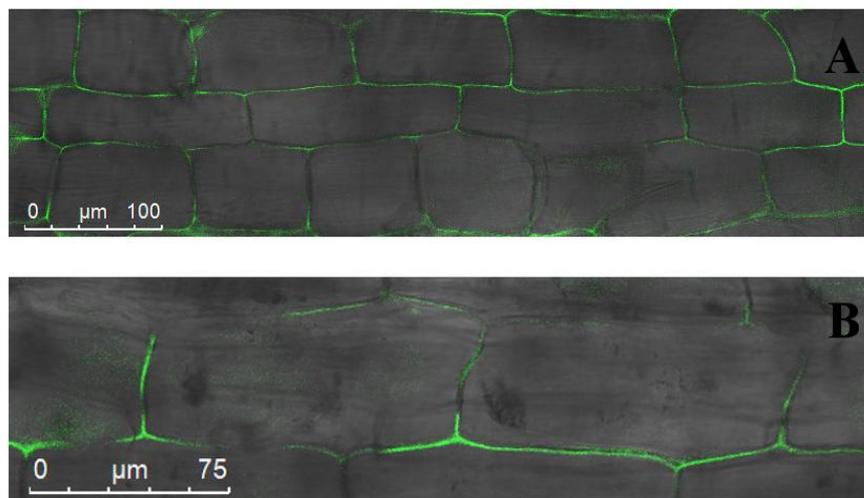


Figura C₂ 5.- Imágenes tomadas al microscopio confocal de la raíz de plántulas de tabaco transgénicas que portan la secuencia que codifica para la proteína de fusión GFP-VviPrx73. En ellas se muestra la señal fluorescente registrada superpuesta a la imagen de luz transmitida en campo claro. Las imágenes fueron tomadas de raíces cuyas células estaban turgentes (A) y también de raíces de plántulas incubadas en una solución de manitol para inducir la plasmólisis de sus células (B).

Las imágenes de las plántulas que producían la proteína de fusión se tomaron mediante el empleo de un microscopio confocal, recogiendo simultáneamente la señal fluorescente (en el rango 505 nm-600 nm) y la imagen de luz transmitida en campo claro. De este modo, superponiendo ambas imágenes, se logró una localización precisa de la fluorescencia en los tejidos. Como se puede ver en la **Figura C₂ 5A**, la

fluorescencia verde aparece en los límites de las células, lo que es compatible con la predicción de que VviPrx73 es una proteína de secreción apoplástica.

No obstante, una localización en el tonoplasto de células turgentes también sería compatible con la señal detectada. Así, para poder discriminar entre estas dos posibilidades, también se tomaron imágenes de la fluorescencia detectada en las plántulas transgénicas tras ser incubadas en una solución de manitol, para lograr la plasmólisis de sus células (**Figura C₂ 5B**). En este caso, también se pudo observar que la señal fluorescente se ubicaba alrededor de las células, apuntando a la localización apoplástica de la proteína de fusión, y por ende de VviPrx73. Sin embargo, las imágenes de luz transmitida en campo claro obtenidas no permiten visualizar la plasmólisis de las células de las plántulas incubadas en la solución de manitol. Esto, sumado a problemas de autofluorescencia durante las visualizaciones, lleva a indicar que, si bien los resultados apuntan a que VviPrx73 es una enzima apoplástica, no podemos considerar que estos sean concluyentes.

C₂ 4.4. Obtención de líneas de tabaco transgénicas que producen VviPrx73

C₂ 4.4.1 Obtención de líneas de tabaco que expresan la secuencia que codifica para VviPrx73

Una vez verificado que el gen de vid anotado como gen de la peroxidasa 73 (*VviPrx73*) codifica para una peroxidasa de clase III capaz de oxidar sustratos de la lignificación, se decidió generar líneas de tabaco transgénicas que produjesen esta proteína, para así analizar el fenotipo de estas plantas y conocer qué alteraciones provoca en ellas la presencia de VviPrx73.

La obtención de las líneas transgénicas se llevó a cabo mediante transformación de discos foliares con *Agrobacterium*. El plásmido empleado fue el mencionado en el apartado C₂ 4.2.1, que porta la región codificante de *VviPrx73*, bajo el control de *PVviACT7* y *TVviACT7*.

Las plantas regeneradas a partir de los discos foliares, fueron analizadas mediante PCR para verificar que poseían el transgén. Aquellas para las que el resultado fue positivo constituyeron los parentales (T₀) a partir de los que se obtuvieron, tal y como se detalla en el apartado A 3. de los Anexos, las líneas transgénicas homocigotas de la T₂.

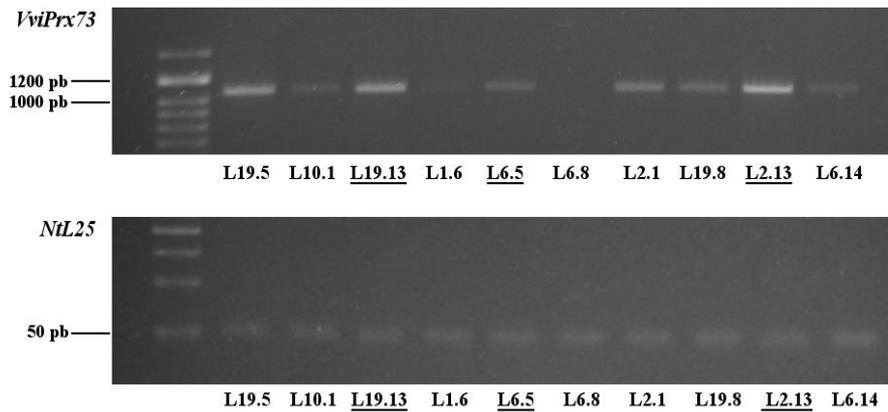


Figura C₂ 6.- Análisis, mediante PCR semicuantitativa, de los niveles de expresión de la región codificante de *VviPrx73* en las líneas de tabaco transgénicas. Como gen de referencia se utilizó el de la proteína ribosomal L25 (*NiL25*). El nombre de cada línea se compone de una L (línea) y de dos números separados por un punto: la cifra antes del punto indica los parentales (T_0) de los que proviene dicha línea, la cifra después del punto indica la planta de la T_1 de la que proviene. Las líneas cuyo nombre aparece subrayado fueron las seleccionadas.

Dado que no todas estas líneas de la T_2 expresan la secuencia que codifica para *VviPrx73* al mismo nivel, se analizaron mediante PCR semicuantitativa, con el objetivo de seleccionar las 3 líneas independientes (aquellas que provienen de diferentes plantas T_0) que mostrasen los mayores niveles de expresión. De acuerdo a los resultados obtenidos (**Figura C₂ 6**), las líneas seleccionadas fueron la 19.13, 6.5 y 2.13, que a partir de ahora, por simplificar, pasarán a denominarse líneas 19, 6 y 2, respectivamente.

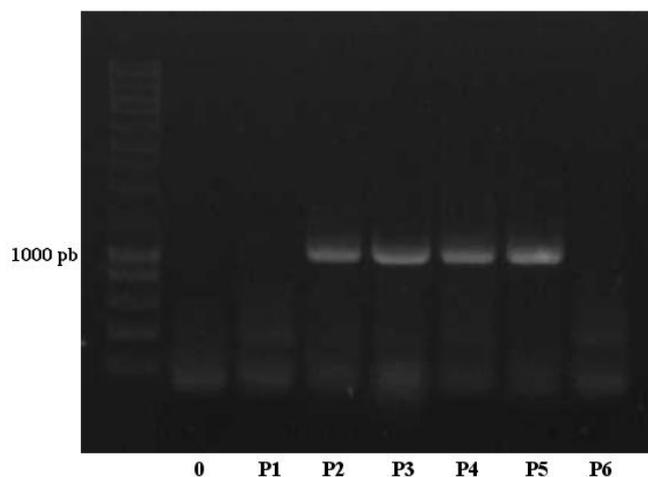


Figura C₂ 7.- Selección, mediante PCR, de algunas de las plantas de tabaco que se usaron como controles. Las plantas seleccionadas fueron aquellas pertenecientes a la T_2 que habían perdido el inserto por segregación (P1 y P6).

P1-P6: planta 1-planta 6 0: control negativo (reacción de PCR en ausencia de ADN)

También se obtuvieron plantas para ser empleadas en los análisis fenotípicos como control. Para ello, se sembraron semillas T_2 que provenían de plantas T_1 heterocigotas y

las plántulas resultantes fueron analizadas mediante PCR (**Figura C₂ 7**) con el objetivo de seleccionar aquellas que no poseían la secuencia que codifica para VviPrx73, al haberla perdido por segregación.

C₂ 4.4.2 Verificación de la presencia de VviPrx73 en las líneas transgénicas seleccionadas

Con el objetivo de verificar la presencia de VviPrx73 en las líneas transgénicas seleccionadas, y a la vez tratar de validar su localización apoplástica, se llevó a cabo la extracción de proteínas apoplásticas del tallo de estas plantas, para ser analizadas mediante diversas técnicas.

En un primer paso, este extracto de proteínas fue sometido a electroforesis disociante SDS-PAGE y en el electroferograma resultante (**Figura C₂ 8**) pudo observarse la presencia de una banda adicional en los carriles que correspondían a las líneas transgénicas (L2, L6 y L19), que no aparecía en el carril del control (C). Esta banda poseía un peso molecular de alrededor de unos 30 kDa, de modo que podría corresponder a VviPrx73, ya que los predictores indican que esta proteína tiene un peso molecular medio de 35,9 kDa, pero hay que tener en cuenta que en apoplasto se encontraría ya sin su péptido señal.

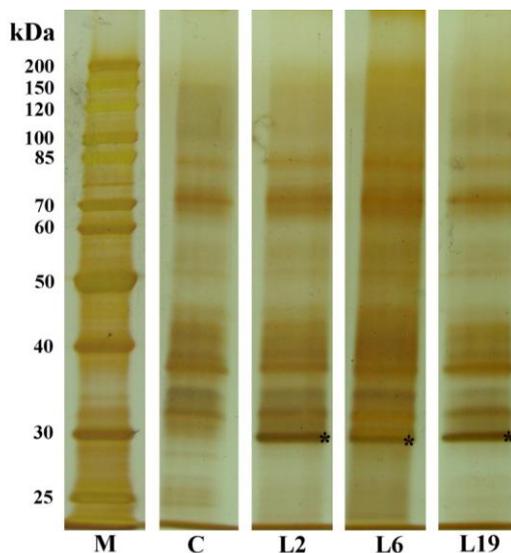


Figura C₂ 8.- Electroferograma de electroforesis disociante SDS-PAGE de extracto de proteínas apoplásticas de tallo de tabaco. Los asteriscos indican la banda que corresponde a VviPrx73.

C: control L2: línea transgénica 2 L6: línea transgénica 6 L19: línea transgénica 19 M: marcador de pesos moleculares

Para verificar la naturaleza de esa banda, se realizó otra electroforesis disociante SDS-PAGE, tiñéndose el gel con azul de Coomassie. Se recortó la banda y se analizó mediante PMF, a través de su digestión triptica y análisis de los fragmentos empleando espectrometría de masas MALDI-TOF.

El análisis, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, de los fragmentos resultantes de la digestión triptica, y la comparación de los resultados con la base de datos NCBIprot usando la herramienta Mascot, reveló la presencia de 14 péptidos que alinean con VviPrx73 (XP_002284278) y que en total cubren un 36,6 % de su secuencia (**Figura C₂ 9**).

10	20	30	40	50	60	70	80
MGRFPLLAIA	MWSLSLSVCV	FPDTASAQLK	QNYIANICPN	VENIVRGVVN	TKFKQTFVTV	PATLRLFFHD	CFVQGCDAV
90	100	110	120	130	140	150	160
IISSTGSNTA	EKDHPDNL ^{SL}	AGDGFDTVIK	AKAEVDK ^{NPT}	CRNKVSCADI	LTMATRDVIA	LSGGPSYAVE	LGRLDGLSST
170	180	190	200	210	220	230	240
SASVNGKLPQ	PTFNLDKLS	LFAAKGLSQT	DMIALSAHT	LGFSHCCKFA	NRIYNFSREN	FVDP ^{TL} DKTY	AAQLQSMCPK
250	260	270	280	290	300	310	320
NVDPRIAIDM	DPTTPK ^K FDN	VYYQNLQ ^Q GK	GLFTSDEVLF	TDSRSKPTVN	TWASSSTAFQ	TAFVQAITKL	GRVGVKTGKN
330	340						
GNIRDCSVF	N						

m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	P	Range	Sequence	Modification
1966.95827	7.273	1	0	31-46	K.QNYIANICPNVENIVR.G	Carbamidomethyl: 8
1507.86873	3.717	1	1	53-65	K.FKQTFVTVPATLR.L	
1232.69262	-5.782	1	0	55-65	K.QTFVTVPATLR.L	
1189.55459	-7.064	1	1	113-122	K.AEVDKNPTCR.N	Carbamidomethyl: 9
1579.80032	4.589	1	1	123-136	R.NKVSCADILTMATR.D	Carbamidomethyl: 5
1595.79394	3.73	1	1	123-136	R.NKVSCADILTMATR.D	Carbamidomethyl: 5; Oxidation: 11
1337.65059	-3.428	1	0	125-136	K.VSCADILTMATR.D	Carbamidomethyl: 3
1413.65537	3.73	1	0	229-240	K.TYAAQLQSMCPK.N	Carbamidomethyl: 10; Oxidation: 9
1782.83484	-39.6	1	1	241-256	K.NVDPRIAIDMDPTTPK.K	
1217.60216	-4.969	1	0	246-256	R.IAIDMDPTTPK.K	Oxidation: 5
1744.87517	5.655	1	1	257-270	K.KFDNVYYQNLQ ^Q GK.G	
1586.77447	3.024	1	0	271-284	K.GLFTSDEVLF ^T DSR.S	
729.367714	-59.95	1	1	320-325	K.NGNIRR.D	
897.378855	-10.55	1	1	325-331	R.RDCSVFN.-	Carbamidomethyl: 3

Figura C₂ 9.- Identificación de VviPrx73 mediante PMF. En la tabla pueden observarse los péptidos que fueron registrados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tras la digestión con tripsina de las proteínas contenidas en la banda del gel, y que alinean con la secuencia de VviPrx73. En la parte superior de la imagen se visualiza la secuencia aminoacídica de VviPrx73 en la que aparecen señalados los péptidos de la tabla.

A la vista de esta coincidencia, se puede confirmar la presencia de VviPrx73 en el apoplasto de las líneas de tabaco transgénicas seleccionadas. Así, además de verificar que los transformantes obtenidos para este estudio producen la proteína VviPrx73, se confirma que nos encontramos ante una enzima apoplástica, al haberse obtenido las muestras por infiltración al vacío.

Complementariamente se realizó un isoelectroenfoque de los extractos de proteínas apoplásticas. Para ello se usó un gel de poliacrilamida con un gradiente de pH de pH=3,0 a pH=10,0, que fue revelado empleando 4-MN como sustrato. En la **Figura C₂ 10** puede observarse el patrón de isoenzimas de peroxidasa obtenido mediante el isoelectroenfoque. En la región correspondiente a las proteínas básicas se visualiza la presencia de dos bandas adicionales (señaladas con asteriscos) en el carril correspondiente a la línea transgénica (T), que no aparecen en el patrón de las plantas control (Co). Una de ellas (asterisco negro) se ubica en el área del gel correspondiente a aquellas peroxidadas con un pI próximo a 10,0, mientras que la otra (asterisco rojo) se localiza en una región correspondiente a peroxidadas con un pI menor. Dado el punto isoeléctrico teórico de VviPrx73, pI=8,78, esta última banda (asterisco rojo) podría corresponder a la presencia de la proteína de vid. Así, estos datos parecen revelar que la expresión de la secuencia que codifica para VviPrx73 lleva a la modificación del patrón de isoenzimas de peroxidasa en las plantas de tabaco transgénicas, afectando exclusivamente a las isoenzimas básicas.

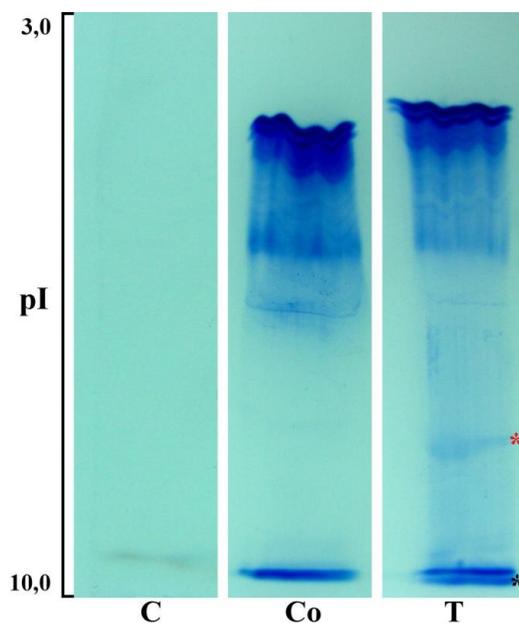


Figura C₂ 10.- Isoelectroenfoque de extracto de proteínas apoplásticas de tallo de tabaco. El asterisco rojo señala la banda que probablemente corresponda a VviPrx73. El asterisco negro señala la banda correspondiente a peroxidadas básicas presentes en el apoplasto de las plantas transgénicas pero no en las control.

C: citocromo c (pI≈10,0) Co: planta control T: planta transgénica (línea 2)

Las plantas poseen numerosas isoenzimas de peroxidasa y la expresión de sus genes está estrictamente controlada y coordinada debido a la importancia de los procesos en

que participan (Cosio y Dunand, 2009), por ello, no sería extraño que ante la alteración que supone la presencia de una nueva peroxidasa, los transformantes respondiesen con la reprogramación de la expresión de genes que codifican para otras peroxidasas, a fin de mantener su homeostasis. De hecho, en el trabajo de Lin *et al.* (2016) los autores dan constancia de este tipo de reprogramación, señalando que plantas de *Populus trichocarpa* transgénicas en las que silenciaron a *PtPrx35*, un gen que codifica para una peroxidasa de xilema, muestran un aumento en la expresión de *PtPrx35*, que codifica para otra peroxidasa de xilema.

C₂ 4.5. Actividad peroxidasa en el apoplasto de las líneas transgénicas

Los extractos de proteínas apoplásticas de tallo de las líneas transgénicas, así como de los controles, fueron empleados para llevar a cabo ensayos de actividad enzimática frente a 3 sustratos: 4-MN, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Esto permitió conocer las alteraciones producidas en la actividad peroxidasa del apoplasto de las plantas transgénicas, debidas a la presencia de VviPrx73.

El 4-MN es un sustrato específico de peroxidasas, de modo que la actividad frente a este sustrato es una medida de actividad peroxidasa total. Como se aprecia en la **Figura C₂ 11**, aunque todas las líneas mostraron un valor medio de actividad peroxidasa frente a 4-MN superior al del control, solo en el caso de la línea 19 se alcanzaron valores significativamente superiores.

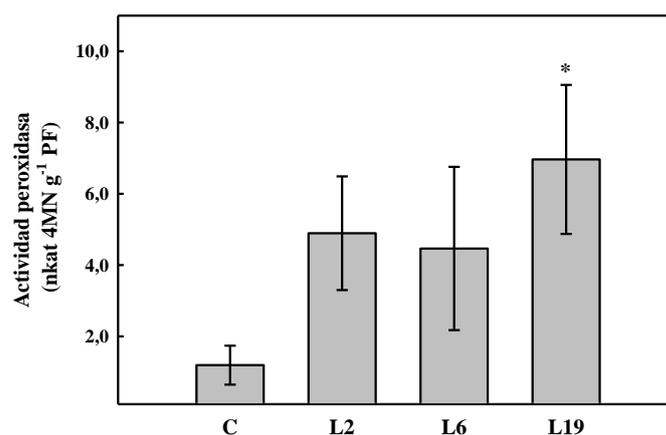


Figura C₂ 11.- Actividad peroxidasa, frente al sustrato 4-MN, de extracto de proteínas apoplásticas de tallos de tabaco. En la gráfica se representan la media y desviación estándar (barras de error) obtenidas del ensayo por triplicado de tres réplicas biológicas para cada línea y control. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$).

PF: peso fresco C: control L2: línea transgénica 2 L6: línea transgénica 6 L19: línea transgénica 19

En las **Figuras C₂ 12A** y **C₂ 12B** se representan los valores medios de actividad peroxidasa frente a los alcoholes coniferílico y sinapílico, respectivamente, de modo que en este caso se ha cuantificado solamente la actividad peroxidasa de aquellas isoformas con capacidad para oxidar este tipo de sustratos de lignificación. Tanto en el caso de la actividad frente al alcohol coniferílico (**Figura C₂ 12A**), como frente al alcohol sinapílico (**Figura C₂ 12B**), las líneas transgénicas mostraron unos valores de actividad medios mayores a los del control de forma significativa. Dentro de las líneas transgénicas, la que mostró el mayor valor de actividad frente a estos sustratos fue la línea 19, seguida por la línea 2 y por último la línea 6. Esto concuerda con los resultados obtenidos de la cuantificación de actividad peroxidasa total (actividad peroxidasa frente al sustrato 4-MN), en que la línea 19 y la 6 poseían la mayor y la menor actividad peroxidasa, respectivamente.

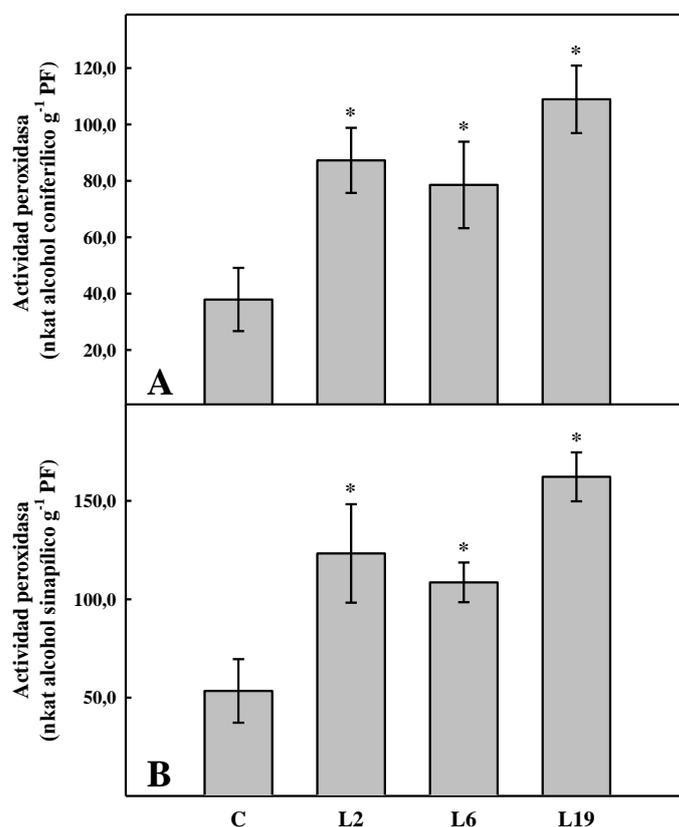


Figura C₂ 12.- Actividad peroxidasa, frente a los sustratos alcohol coniferílico (A) y alcohol sinapílico (B), de extracto de proteínas apoplásticas de tallos de tabaco. En las gráficas se representan la media y desviación estándar (barras de error) obtenidas del ensayo por triplicado de tres réplicas biológicas para cada línea y control. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($P < 0,05$).

PF: peso fresco C: control L2: línea transgénica 2 L6: línea transgénica 6 L19: línea transgénica 19

Si a los valores de actividad peroxidasa frente a los alcoholes coniferílico y sinapílico en el apoplasto de cada línea transgénica se les restan sus respectivos valores registrados en las plantas control, se obtienen los valores de actividad coniferil- y sinapil- peroxidasa, respectivamente, debidos a la presencia de VviPrx73 (**Figura C₂ 13A**). El resultado de estos cálculos indica que la presencia de esta enzima contribuye a un mayor aumento en la actividad sinapil-peroxidasa que en la coniferil-peroxidasa en el apoplasto de las líneas transgénicas, dato que contrasta con los resultados obtenidos en el apartado C₂ 4.2.3, que señalaban la clara preferencia de esta enzima por el alcohol coniferílico frente al sinapílico.

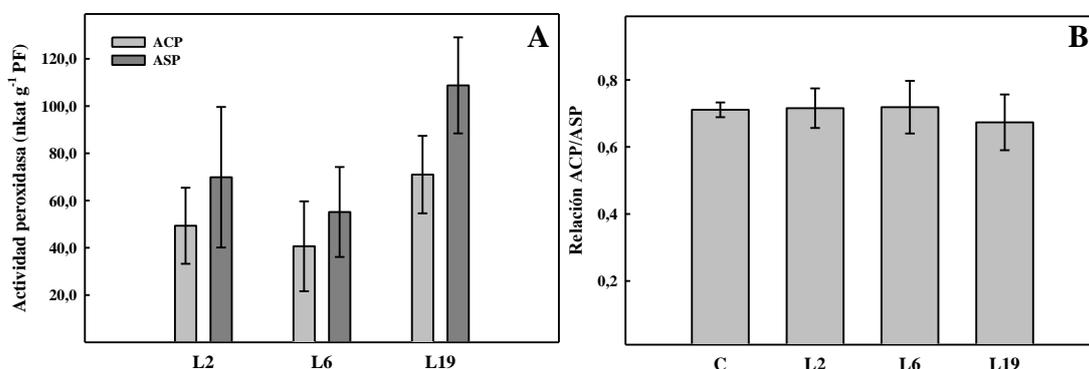


Figura C₂ 13.- A: resultado de la resta del valor de actividad peroxidasa en el apoplasto de los controles al valor de actividad peroxidasa en el apoplasto de las líneas transgénicas. B: relación actividad coniferil-peroxidasa/actividad sinapil-peroxidasa en el apoplasto de los tallos de tabaco. En las gráficas se representan la media y desviación estándar (barras de error) obtenidas del ensayo por triplicado de tres réplicas biológicas para cada línea y control. En la figura B el análisis de la varianza (ANOVA) de los datos reveló que no existen diferencias entre los *ratios* ($P \geq 0,05$).

PF: peso fresco ACP: actividad coniferil-peroxidasa ASP: actividad sinapil-peroxidasa C: control L2: línea transgénica 2 L6: línea transgénica 6 L19: línea transgénica 19

Por otra parte, si se dividen los valores de actividad frente a alcohol coniferílico entre los valores de actividad frente a alcohol sinapílico (**Figura C₂ 13B**), se observa que los *ratios* obtenidos son los mismos en el control que en cada una de las líneas transgénicas. De este modo, las plantas transgénicas muestran una mayor actividad frente a estos sustratos en su apoplasto, en comparación con las plantas control, sin embargo mantienen el mismo *ratio* actividad coniferil-peroxidasa/actividad sinapil-peroxidasa que los controles.

La mayoría de peroxidases que oxidan eficientemente el alcohol sinapílico pertenecen al grupo de las peroxidases básicas (**Ros Barceló et al., 2004**), de modo que la modificación en el patrón de isoformas de peroxidasa básicas en el apoplasto de los

transformantes (apartado C₂ 4.4.2) podría responder al mayor aumento de la actividad sinapil-peroxidasa, respecto a la coniferil-peroxidasa, en estas plantas. Además, el hecho de que la actividad sinapil-peroxidasa aumentase en los tabacos transgénicos en la medida necesaria para mantener el mismo *ratio* actividad coniferil-peroxidasa/actividad sinapil-peroxidasa que en las plantas control apoya la idea de que estos cambios puedan constituir un mecanismo puesto en marcha por los transformantes para hacer frente a las alteraciones que pudiera ocasionar en ellos la presencia de VviPrx73.

C₂ 5. Resumen

Los resultados obtenidos confirman que el gen VIT_07s0129g00360 de *Vitis vinifera*, anotado como gen de la peroxidasa 73, codifica para una peroxidasa de clase III, VviPrx73.

Las imágenes de la señal fluorescente generada por la proteína de fusión GFP-VviPrx73, tomadas al microscopio confocal, apuntan a la localización apoplástica de VviPrx73, si bien no se considera que estos datos sean concluyentes debido a las dificultades surgidas durante las visualizaciones. Sin embargo, la presencia de VviPrx73 en el apoplasto de las líneas de tabaco transgénicas, confirmada mediante PMF, ratifica que estamos ante una peroxidasa de secreción extracelular.

Los ensayos de actividad enzimática llevados a cabo con la muestra enriquecida en VviPrx73 (obtenida a partir de los extractos proteicos de plantas agroinfiltradas) revelaron que esta enzima es capaz de oxidar tanto el alcohol sinapílico como el alcohol coniferílico, con una clara preferencia por el segundo. Este dato concuerda con el hecho de que VviPrx73 solo posee algunos de los motivos típicos de las peroxidases de tipo S. Esta capacidad para oxidar sustratos de la lignificación, junto con su localización apoplástica, apuntan a que pueda tratarse de una peroxidasa implicada en la síntesis de las ligninas.

La expresión de la secuencia que codifica para VviPrx73 en plantas de tabaco, lleva a que la actividad peroxidasa frente a sustratos de la lignificación en el apoplasto de los transformantes sea superior a la observada en el apoplasto de los controles. Sin embargo, sorprende que la presencia de esta enzima contribuya más al aumento de la actividad sinapil-peroxidasa que al de la coniferil-peroxidasa. Lo esperable, atendiendo a lo enunciado en el anterior párrafo, sería que la presencia de VviPrx73 produjese un notable incremento en la actividad coniferil-peroxidasa y tan solo un leve aumento en la actividad sinapil-peroxidasa. Por otra parte, el resultado del cálculo de la relación actividad coniferil-peroxidasa/actividad sinapil-peroxidasa es el mismo para las plantas transgénicas que para los controles.

Estos resultados podrían tener su justificación en la modificación del patrón de isoformas de peroxidasa en el apoplasto de los tabacos transgénicos. Como mostraron los análisis mediante isoelectroenfoque, se produjo un cambio en el patrón de isoformas de peroxidasa básicas en el apoplasto de los transformantes, respecto a los controles. Este cambio podría responder a una reprogramación en la expresión de genes que

codifican para peroxidasas tipo S (generalmente peroxidasas básicas), con el objetivo de mantener inalterado el *ratio* actividad coniferil-peroxidasa/actividad sinapil-peroxidasa a pesar de la presencia de VviPrx73, tal y como se observó.

Este *ratio* es uno de los factores que influyen en la composición de las ligninas (Tsutsumi *et al.*, 1998), por tanto esa reprogramación de la expresión génica podría constituir un mecanismo de mantenimiento de la homeostasis que se habría puesto en marcha con el objetivo de evitar una variación en la composición de las ligninas de los transformantes, debida a la presencia de la peroxidasa de vid, y así pues, mantener inalteradas las características de sus paredes celulares.

C₂ 6. Bibliografía

An Y, Wu W y Lv A. 2010. A PCR-after-ligation method for cloning of multiple DNA inserts. *Anal Biochem* 402: 203-205.

Bacic A, Harris PJ y Stone BA. 1988. Structure and function of plant cell walls. En: Preiss J (ed.). *The biochemistry of plants*, vol. 14. Academic Press. New York, USA. pp. 297-371.

Barceló AR y Pomar F. 2001. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. *Phytochemistry* 57: 1105-1113.

Barceló AR, Ros LV y Carrasco AE. 2007. Looking for syringyl peroxidases. *Trends Plant Sci* 12: 486-491.

Blee KA, Choi JW, O'Connell AP, Schuch W, Lewis NG y Bolwell GP. 2003. A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry* 64: 163-176.

Boerjan W, Ralph J y Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519-546.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Campbell TN y Choy FYM. 2001. The effect of pH on green fluorescent protein: a brief review. *Mol Biol Today* 2: 1-4.

Chabanet A, Goldberg R, Catesson AM, Quinet-Szely M, Delaunay AM y Faye L. 1994. Characterization and localization of a phenoloxidase in mung bean hypocotyl cell walls. *Plant Physiol* 106: 1095-1102.

Chée R y Pool RM. 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. *Sci Hortic (Amsterdam)* 32: 85-95.

Clemente T. 2006. *Nicotiana (Nicotiana tobaccum, Nicotiana benthamiana)*. En: Wang K (ed.). *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 343. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. pp. 143-154.

Cosio C y Dunand C. 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J Exp Bot* 60: 391-408.

Cosio C, Ranocha P, Francoz E, Burlat V, Zheng Y, Perry SE, Ripoll JJ, Yanofsky M y 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 Phytol* 213: 250-263.

Costa MM, Hilliou F, Duarte P, Pereira LG, Almeida I, Leech M, Memelink J, Barceló AR y Sottomayor M. 2008. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 146: 403-417.

Delaunois B, Colby T, Belloy N, Conreux A, Harzen A, Baillieul F, Clément C, Schmidt J, Jeandet P y Cordelier S. 2013. Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes. *BMC Plant Biol* 13: 24.

Di Genova A, Almeida AM, Muñoz-Espinoza C, Vizoso P, Travisany D, Moraga C, Pinto M, Hinrichsen P, Orellana A y Maass A. 2014. Whole genome comparison between table and wine grapes reveals a comprehensive catalog of structural variants. *BMC Plant Biol* 14: 7.

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S y von Heijne G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005-1016.

Fasoli M, Dal Santo S, Zenoni S, Tornielli GB, Farina L, Zamboni A, Porceddu A, Venturini L, Bicego M, Murino V, Ferrarini A, Delledonne M y Pezzotti M. 2012. The grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program. *Plant Cell* 24: 3489-3505.

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

Ferreira RB, Monteiro SS, Piçarra-Pereira MA y Teixeira AR. 2004. Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends Biotechnol* 22: 168-173.

Freeman B y Beattie G. 2008. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Heal Instr* doi: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.

Fry SC. 2004. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol* 161: 641-675.

Gabaldón C, López-Serrano M, Pedreño MA y Barceló AR. 2005. Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol* 139: 1138-1154.

Grimplet J, Van Hemert J, Carbonell-Bejerano P, Díaz-Riquelme J, Dickerson J, Fennell A, Pezzotti M y Martínez-Zapater JM. 2012. Comparative analysis of grapevine whole-genome gene predictions, functional annotation, categorization and integration of the predicted gene sequences. *BMC Res Notes* 5: 213.

Gupta R, Jung E y Brunak S. 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.

Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC y Hodge S. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2122-2127.

Henriksen A, Smith AT y Gajhede M. 1999. The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *J Biol Chem* 274: 35005-35011.

Hepler PK, Fosket DE y Newcomb EH. 1970. Lignification during secondary wall formation in *Coleus*: an electron microscopic study. *Am J Bot* 57: 85-96.

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

Herrero J, Fernández-Pérez F, Yebra T, Novo-Uzal E, Pomar F, Pedreño MA, Cuello J, Guéra A, Esteban-Carrasco A y 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 y Matsui H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42: 462-468.

Jaillon O, Aury JM, Noël B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pe ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F y Wincker P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-467.

Jin J, Hewezi T y Baum TJ. 2011. *Arabidopsis* peroxidase AtPRX53 influences cell elongation and susceptibility to *Heterodera schachtii*. *Plant Signal Behav* 6: 1778-1786.

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

Kumar S, Stecher G y Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874.

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

Leng X, Jia H, Sun X, Shangguan L, Mu Q, Wang B y Fang J. 2015. Comparative transcriptome analysis of grapevine in response to copper stress. *Sci Rep* 5: 17749.

Lin CY, Li Q, Tunlaya-Anukit S, Shi R, Sun YH, Wang JP, Liu J, Loziuk P, Edmunds CW, Miller ZD, Peszlen I, Muddiman DC, Sederoff RR y Chiang VL. 2016. A cell wall-bound anionic peroxidase, PtrPO21, is involved in lignin polymerization in *Populus trichocarpa*. *Tree Genet Genomes* 12: 22.

Liu H, Yang W, Liu D, Han Y, Zhang A y Li S. 2011. Ectopic expression of a grapevine transcription factor *VvWRKY11* contributes to osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep* 38: 417-427.

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

Mohnen D, Bar-Peled M y Somerville CR. 2008. Cell wall polysaccharide synthesis. En: Himmel ME (ed.). *Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Blackwell Publishing. Singapore. pp. 94-187.

Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Mzid R, Marchive C, Blancard D, Deluc L, Barrieu F, Corio-Costet MF, Drira N, Hamdi S y Lauvergeat V. 2007. Overexpression of *VvWRKY2* in tobacco enhances broad resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Physiol Plant* 131: 434-447.

Nicholson RL y Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* 30: 369-389.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S y von Heijne G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10: 1-6.

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

Oakley BR, Kirsch DR y Morris NR. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105: 361-363.

Østergaard L, Teilum K, Mirza O, Mattsson O, Petersen M, Welinder KG, Mundy J, Gajhede M y Henriksen A. 2000. *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol Biol* 44: 231-243.

Passardi F, Cosio C, Penel C y Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* 24: 255-265.

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

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G y Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785-786.

Pomar Barbeito F. 2000. Caracterización de la actividad peroxidasa implicada en los procesos de lignificación y su estudio en la interacción *Capsicum annuum* L. var. *annuum-Verticillium dahliae* Kleb. Tesis doctoral. Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidade da Coruña.

Raggi S, Ferrarini A, Delledonne M, Dunand C, Ranocha P, De Lorenzo G, Cervone F y Ferrari S. 2015. The Arabidopsis class III peroxidase AtPRX71 negatively regulates growth under physiological conditions and in response to cell wall damage. *Plant Physiol* 169: 2513-2525.

Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M, Boudet AM y Goffner D. 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases-a divergent gene family-in poplar. *Eur J Biochem* 259: 485-495.

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

Richardson A, Stewart D y McDougall GJ. 1997. Identification and partial characterization of a coniferyl alcohol oxidase from lignifying xylem of sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Planta* 203: 35-43.

Ros Barceló A. 1997. Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* 176: 87-132.

Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS y Pedreño MA. 2004. Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution? *Phytochem Rev* 3: 61-78.

Sainsbury F, Saxena P, Geisler K, Osbourn A y Lomonossoff GP. 2012. Using a virus-derived system to manipulate plant natural product biosynthetic pathways. En: Hopwood DA (ed.). *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part C. Methods in Enzymology*, vol. 517. Academic Press. San Diego, California, USA. pp. 185-202.

Sato Y, Demura T, Yamawaki K, Inoue Y, Sato S, Sugiyama M y 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 Physiol* 47: 493-503.

Schmidlin L, Poutaraud A, Claudel P, Mestre P, Prado E, Santos-Rosa M, Wiedemann-Merdinoglu S, Karst F, Merdinoglu D y Hugueney P. 2008. A stress-inducible resveratrol *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiol* 148: 1630-1639.

Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, Cabello FC, Sutherland M y Ladisch S. 2004. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res* 32: e19.

Smith AH, Gill WM, Pinkard EA y Mohammed CL. 2007. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. *For Path* 37: 361-373.

Sterjiades R, Dean JFD y Eriksson KEL. 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol* 99: 1162-1168.

Tsutsumi Y, Matsui K y Sakai K. 1998. Substrate-specific peroxidases in woody angiosperms and gymnosperms participate in regulating the dehydrogenative polymerization of syringyl and guaiacyl type lignins. *Holzforschung* 52: 275-281.

Udagama-Randeniya PV y Savidge RA. 1995. Coniferyl alcohol oxidase-a catechol oxidase? *Trees (Berl West)* 10: 102-107.

Vance CP, Kirk TK y Sherwood RT. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann Rev Phytopathol* 18: 259-288.

Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Demattè L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F y Viola R. 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* 2: e1326.

Vidal JR, Gómez C, Cutanda MC, Shrestha BR, Bouquet A, Thomas MR y Torregrosa L. 2010. Use of gene transfer technology for functional studies in grapevine. *Aust J Grape Wine Res* 16: 138-151.

Vitulo N, Forcato C, Carpinelli EC, Telatin A, Campagna D, D'Angelo M, Zimbello R, Corso M, Vannozzi A, Bonghi C, Lucchin M y Valle G. 2014. A deep survey of alternative splicing in grape reveals changes in the splicing machinery related to tissue, stress condition and genotype. *BMC Plant Biol* 14: 99.

Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgård IV, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM y Duroux L. 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 269: 6063-6081.

Weng JK y Chapple C. 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol* 187: 273-285.

Zheng H, Kunst L, Hawes C y Moore I. 2004. A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Plant J* 37: 398-414.

C₃ ~ Capítulo 3

C₃ 1. Introducción

Las ligninas son heteropolímeros tridimensionales que resultan del acoplamiento oxidativo de tres monolignoles, los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, en una reacción mediada por lacasas y peroxidasas de clase III (**Boudet et al., 1995; Ros Barceló, 1997**). Esta reacción de entrecruzamiento produce un heteropolímero hidrofóbico ópticamente inactivo (**Ralph et al., 2004**) compuesto de unidades *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, respectivamente.

En un principio, se pensaba que las ligninas se encontraban exclusivamente en las plantas vasculares, sin embargo, también se ha constatado su presencia en plantas no vasculares, como el briófito *Marchantia polymorpha* L. (**Espiñeira et al., 2011**) y el alga roja *Calliarthron cheilosporioides* Manza (**Martone et al., 2009**).

Estos polímeros son depositados en las paredes de varios tipos celulares especializados: elementos traqueales del xilema, células del esclerénquima, células endodermales, células de la cubierta de las semillas y células de las silicuas (**Barros et al., 2015**), reforzando las paredes y confiriéndoles rigidez, hidrofobicidad, resistencia a la disrupción mecánica y a la degradación de los polisacáridos de pared (**Vanholme et al., 2010; Boerjan et al., 2003; Ralph et al., 2004; Rogers y Campbell, 2004; Whetten y Sederoff, 1995**).

El hecho de que los tres monómeros que constituyen las ligninas difieran en su grado de metoxilación, y que para cada uno de ellos el radical tenga al menos 5 formas mesoméricas, es indicativo de que durante la dimerización se pueden formar una gran variedad de subestructuras diferentes (**Ros Barceló et al., 2004**). Las unidades fenilpropanoides son interconectadas en las ligninas por medio de uniones de tipo éter y carbono-carbono (**Ralph et al., 2004**), que llevan a las principales subestructuras: guaiacilglicerol- β -aril éter, fenilcumarano, diaril propano, resinol, bifenil y difenil éter, así como a otras subestructuras de menor importancia. Los enlaces β -O-4 más frecuentes están presentes en las subestructuras guaiacilglicerol- β -aril éter, que son las dianas de la mayoría de procesos de despolimerización de las ligninas, incluida la tioacidolisis. En contraste, otras uniones entre unidades, tales como β -5 (en el fenilcumarano), β -1 (en el diaril propano), β - β (en resinol), 5-5 (en el bifenil) y 5-O-4 (en el difenil éter), son muy resistentes a la degradación (**Ros Barceló et al., 2004**). Además de los monómeros clásicos, H, G y S, también pueden formar parte del

polímero de ligninas otras moléculas. Estas subunidades son llamadas no canónicas, entre las que se incluyen ferulatos, hidroxicinamaldehídos (coniferilaldehído y sinapilaldehído), alcoholes dihidrocinámicos y monolignoles acetilados (**Ralph et al., 2008; Wang et al., 2013**). Todo esto da una idea de cuan heterogéneas son las ligninas como polímero.

El contenido en ligninas y su composición varía según el grupo taxonómico, en los diferentes individuos de una población, según el tejido, tipo celular, estado del desarrollo e incluso dependiendo de las condiciones ambientales (**Wardrop, 1976; Monties, 1985; Monties, 1991; Monties y Lapierre, 1981; Wu et al., 1992; He y Terashima, 1991**). Dentro de las plantas vasculares existe una variación bastante distintiva en la composición monomérica de las ligninas entre gimnospermas y angiospermas. En las gimnospermas, las ligninas están compuestas típicamente por unidades G, con una proporción menor de unidades H, mientras que en las angiospermas las ligninas están compuestas generalmente de niveles similares de unidades G y S (**Higuchi, 1990**). Sin embargo hay excepciones, dado que existen gimnospermas en que predominan las unidades S y algunas angiospermas en que sus ligninas son principalmente de tipo G (**Lewis y Yamamoto, 1990**). También dentro de una misma planta existe una gran variación en las ligninas. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. los elementos traqueales del xilema poseen paredes celulares secundarias reforzadas por la deposición de ligninas compuestas principalmente de unidades G (**Terashima y Fukushima, 1989; Higuchi, 1990**). Por otra parte, las ligninas de las paredes celulares secundarias de las fibras del esclerénquima y las esclereidas se componen principalmente de unidades S (**Higuchi, 1990**). Incluso existe variación dentro de una misma pared celular. Las ligninas ricas en unidades *p*-hidroxifenilo son depositadas principalmente en las paredes celulares primarias y están fuertemente unidas con enlaces cruzados (**Terashima y Fukushima, 1988; Chabannes et al., 2001; Ruel et al., 2002**), mientras que las ligninas ricas en unidades guaiacilo y siringilo son depositadas principalmente en paredes celulares secundarias y el polímero formado posee una conformación más lineal, en el cual los esqueletos de los monolignoles son unidos por enlaces β -O-4 (**Chabannes et al., 2001; Ruel et al., 2002**). Además, el tipo de polimerización de los monómeros difiere en las distintas regiones de la pared. Mientras que en la pared celular primaria y lámina media se da una polimerización rápida, en masa, que favorece el acoplamiento C-C de los monolignoles en polímeros altamente ramificados, ricos en uniones β -5, β -1, β - β , 5-5 y 5-O-4 entre

unidades, en las paredes celulares secundarias se da una polimerización lenta, lineal, que favorece las uniones β -O-4 de los monolignoles en polímeros relativamente lineales (**Lai y Sarkanen, 1975**).

La diferente composición monomérica de las ligninas impacta de forma significativa en su estructura general y, por tanto, es muy importante a la hora de determinar sus propiedades. Así por ejemplo, comparando especies de angiospermas y gimnospermas con un contenido en ligninas similar **Chiang et al. (1988)** observaron que la deslignificación era más fácil en las angiospermas. Esto es debido a los diferentes tipos de enlaces que se pueden establecer entre los distintos tipos de monómeros. En las ligninas de tipo G se establecen fuertes enlaces carbono-carbono (5-5), que se forman entre residuos de alcohol coniferílico. Estos enlaces no pueden darse entre residuos de alcohol sinapílico, debido al grupo metoxilo presente en la posición C5 de su anillo aromático. De este modo, la presencia de unidades S facilita los procesos de deslignificación debido a una frecuencia relativa mayor de uniones β -O-4, que son enlaces más débiles, y la menor frecuencia de las fuertes uniones 5-5 (**Bonawitz y Chapple, 2010; Baucher et al., 1998**). La composición de las ligninas no solo dependerá de los monómeros disponibles en la zona de lignificación, sino también del tipo de enzimas que medien esa polimerización. Como ya se indicó en otros capítulos, las peroxidasas responsables de la oxidación de los monolignoles pueden mostrar diferentes especificidades de sustrato, mientras que algunas aceptan casi exclusivamente alcohol coniferílico, otras son altamente específicas hacia el alcohol sinapílico (**Marjamaa et al., 2006; Gómez Ros et al., 2007**).

Además de la composición propia del polímero de ligninas, estas pueden unirse a azúcares hemicelulósicos (xilosa, arabinosa, manosa y glucosa), a las celulosas, pectinas, o a los ácidos hidroxicinámicos (**Lai, 1991**). También pueden aparecer asociadas a glicoproteínas o taninos (**Monties, 1989**). Estas asociaciones, junto con el contenido y composición de las ligninas, determinarán en gran medida las propiedades físicas de las paredes celulares.

En este capítulo se presentan los resultados del análisis fenotípico de las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) transgénicas que portan la región codificante del gen de la peroxidasa 73 de vid (*Vitis vinifera* L.) (*VviPrx73*), obtenidas como se detalla en el Capítulo 2. Estos análisis abarcan desde la evaluación de posibles modificaciones en los polímeros de las paredes celulares de los transformantes, al estudio de las propiedades mecánicas de sus tallos y posibles alteraciones en el crecimiento, con el objetivo de

C₃-Capítulo 3

esclarecer cuál podría ser la función de la peroxidasa 73 de vid (*VviPrx73*) *in planta*, y si podría constituir una diana interesante en programas de mejora.

C₃ 2. Objetivos

Análisis cuantitativo y cualitativo de las ligninas de las líneas de tabaco transgénicas, para tratar de confirmar el papel de VviPrx73 en la polimerización de las ligninas y conocer qué modificaciones en dicho polímero conlleva su presencia.

Análisis de los carbohidratos de las paredes celulares de las líneas transgénicas, para conocer si la presencia de VviPrx73 lleva a alteraciones en otros polímeros de las paredes distintos a las ligninas.

Análisis de las propiedades mecánicas de los tallos de los transformantes. Mediante la obtención del valor de su módulo E, o módulo de Young, se podrá conocer si las posibles modificaciones en las paredes celulares de las líneas transgénicas conllevan alteraciones en las propiedades mecánicas de las mismas.

Análisis de la curva de crecimiento y momento de la floración de las líneas transgénicas. Con ello se podrá observar si la presencia de VviPrx73 provoca alteraciones en el ritmo de desarrollo de los transformantes.

C₃ 3. Materiales y métodos

Las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana) analizadas en este capítulo pertenecen a las líneas transgénicas homocigotas independientes de la T₂ mencionadas en el apartado C₂ 4.4.1 del Capítulo 2. Las plantas empleadas como control se seleccionaron tal y como se detalla en ese mismo apartado.

C₃ 3.1. Localización histoquímica de ligninas

Se llevaron a cabo la tinción de Wiesner y la de Mäule en secciones transversales de tallos de plantas de tabaco de 2 meses, que fueron crecidas en tierra desde semillas, bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C. *En el momento en que se tomaron las muestras para las tinciones, todas las plantas se encontraban en el mismo estado de desarrollo, plantas adultas en el momento del inicio de la floración.* Los cortes se realizaron a 10 cm de la base del tallo y de forma manual, con una cuchilla de microtomo.

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

C₃ 3.1.1 Tinción de Wiesner

La tinción de Wiesner es específica para los *O*-4-hidroxicinamil aldehídos terminales contenidos en las ligninas (**Pomar *et al.*, 2002b**). Las secciones de los tallos se infiltraron al vacío con una solución de floroglucinol (1, 3, 5-trihidroxibenceno) al 1 % en HCl:etanol (25:75) durante 10 minutos. Posteriormente se depositaron en un vidrio de reloj con agua destilada para realizar las observaciones y fotografías.

C₃ 3.1.2 Tinción de Mäule

Esta tinción es específica para los grupos S de las ligninas (**Trabucco *et al.*, 2013**). Las secciones transversales se infiltraron al vacío durante 10 minutos con KMnO₄ al 1 % en agua. A continuación, se lavaron con agua destilada y se destiñeron con HCl al 37 % durante 30 segundos. Las secciones se lavaron nuevamente con agua destilada y se introdujeron en amoníaco 0,5 M durante 5 minutos. Posteriormente, se transfirieron a un vidrio de reloj con agua destilada para realizar las observaciones y fotografías.

C₃ 3.2. Obtención de las paredes celulares

El método utilizado fue el descrito por **Pomar *et al.* (2002a)** con algunas modificaciones.

El material vegetal de partida consistió en los segmentos de tallos de tabaco descartados tras la extracción de sus proteínas apoplásticas (apartado C₂ 3.8. del Capítulo 2). Estos segmentos fueron homogeneizados a 4 °C en presencia de tampón Tris-acetato 50 mM (pH=5,0) con 1M KCl. El homogeneizado se centrifugó durante 20 minutos a 15000g y a 4 °C. Tras este tiempo se retiró el sobrenadante y el precipitado fue secado en estufa para posteriormente ser homogeneizado en un Mini beadbeaterTM (BioSpec Products) hasta obtener un polvo fino.

Los restos de tallo pulverizados se lavaron con agua destilada, centrifugando durante 15 minutos a 1800g. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con Triton X-100 al 1 %, centrifugando durante 15 minutos a 1800g, como en el paso anterior. Este lavado con Triton X-100 se repitió 3 veces más. Seguidamente, se realizaron 4 lavados del precipitado con agua destilada. A los que siguieron varios lavados con etanol al 70 %, hasta que el sobrenadante fue completamente transparente. Por último, las paredes se lavaron con etanol 96 % y se secaron por filtración al vacío, lavándolas 2 veces con etanol al 96 % y tres con éter dietílico. Finalmente, se mantuvieron 3 días en una estufa a 65 °C para que quedasen totalmente secas y sin restos de éter dietílico.

C₃ 3.3. Análisis de las paredes celulares

C₃ 3.3.1 Cuantificación de ligninas con bromuro de acetilo

Para la cuantificación de ligninas se siguió el procedimiento descrito por **Iiyama y Wallis (1988)**.

Se pesaron entre 3-5 mg de paredes celulares, a las que se añadieron 500 µl de una mezcla de ácido acético/bromuro de acetilo 1/0,2. A continuación, las muestras se incubaron a 70 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar y se añadió 1 ml de NaOH 2N. Finalmente se enrasó a 10 ml con ácido acético. Tras dejar reposar las muestras para que precipitasen las partículas en suspensión, se midió la absorbancia a 290 nm. Para calcular la concentración de ligninas se usó un factor de absorptividad de 20,091g⁻¹cm⁻¹ según la estimación de **Iiyama y Wallis (1988)**.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo tal y como se detalló en el apartado C₂ 3.10.3 del Capítulo 2.

C₃ 3.3.2 Análisis mediante espectroscopía FTIR (*Fourier transform infrared*)

Estos análisis se realizaron en la Unidad de Espectroscopía Molecular de los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña.

Los espectros se realizaron usando un espectrómetro Bruker Vector 22 FTIR (Bruker Optics, Madrid, España), equipado con un ATR de reflexión simple con prisma de diamante Golden Gate (Specac), cuyo brazo permitió aplicar una presión constante a la muestra sobre el cristal, para conseguir un contacto perfecto entre la muestra y el haz de infrarrojos incidente, evitando la pérdida de radiación incidente. Se obtuvieron 30 espectros de infrarrojo entre 300 y 4000 cm⁻¹ para cada réplica, con una resolución de 4 cm⁻¹. Los datos obtenidos de los espectros de FTIR se analizaron con el programa OPUS 5.5 de Bruker para su normalización (*vector normalization*) y corrección de la línea base (*rubberband correction*).

El análisis de componentes principales se llevó a cabo con el programa informático SPSS.

C₃ 3.3.3 Oxidación de las paredes celulares con nitrobenzono

La oxidación alcalina con nitrobenzono de las paredes celulares y los análisis de HPLC (*high performance liquid chromatography*) de los productos obtenidos se llevaron a cabo según Pomar *et al.* (2002a).

Para cada reacción se emplearon en torno a 25 mg de paredes celulares, a los que se añadieron 2,5 ml de NaOH 2N y 0,25 ml de nitrobenzono. Se incubaron durante 150 minutos a 170 °C, agitando suavemente cada cierto tiempo. Terminada la incubación, se dejaron enfriar las muestras y se les añadieron 4 ml de agua destilada y 4 ml de diclorometano. Se agitó vigorosamente y se recogió la fase superior, pasándola a otro tubo. Se añadieron 0,5 ml de HCl al 37 % y 5 ml de diclorometano:acetato de etilo (1:1), se agitó y se centrifugó 2 minutos a 500g.

La fase orgánica se transfirió a otro recipiente y la fase acuosa se sometió a otra extracción con 5 ml de diclorometano:acetato de etilo (1:1), tal y como se hizo la primera vez. En total se realizaron 3 extracciones, recogiendo en cada una de ellas la fase orgánica y sometiendo a la fase acuosa a una nueva extracción.

Seguidamente se le añadió Na₂SO₄ en exceso al conjunto de las extracciones. Se filtraron sobre matraces corazón y se evaporaron a sequedad en un rotavapor con el baño a 40 °C.

El residuo final se resuspendió en 1 ml de metanol, se pasó a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm y se ajustó el volumen final de nuevo a 1 ml con metanol.

Los productos obtenidos mediante la oxidación con nitrobenzono se analizaron por HPLC en una columna de fase reversa Spherisorb ODS2 C18. Para ello se usó un equipo Waters Alliance, equipado con un detector de diodos Waters 2996. Para llevar a cabo la cromatografía se utilizaron las mezclas de solventes A, que contenía acetonitrilo al 50 % y ácido acético al 2 % y B, que se trataba de ácido acético al 2 %. El programa usado consistió en un gradiente de: 35 % solvente A, 65 % solvente B minuto 0; 40 % solvente A, 60 % solvente B minuto 5; 50 % solvente A, 50 % solvente B minuto 14 y 35 % solvente A, 65 % solvente B minuto 16. La cuantificación del *p*-hidroxibenzaldehído, la vanillina y el siringaldehído se realizó a 280 nm usando los correspondientes estándares comerciales.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo tal y como se detalló en el apartado C₂ 3.10.3 del Capítulo 2.

C₃ 3.3.4 Análisis cualitativo mediante tioacidolisis

La técnica empleada para la realización de la tioacidolisis fue la descrita por **Lapierre et al. (1995)**. Para llevar a cabo la reacción, se pesaron 5 mg de las paredes celulares y se mezclaron con 10 ml de una disolución de boro trifluoruro-éter dietílico 0,2 M en una mezcla de dioxano:etanotiol (8,75:1). La tioacidolisis se realizó en tubos de vidrio PYREX sellados con tapón con politetrafluoroetileno (Teflon), en un termobloque a 100 °C durante 4 h, agitando suavemente cada cierto tiempo.

Una vez transcurridas las 4 h, se añadieron 30 ml de agua destilada con el fin de detener la reacción y enfriar la mezcla. Seguidamente, se ajustó el pH a un valor entre 3,0 y 4,0 con una solución 0,4 M de Na₂CO₃. Una vez ajustado el pH se procedió a la extracción, con 30 ml de diclorometano al que se añadieron 0,167 mg de tetracosano como estándar interno y usando un embudo de decantación. Esta extracción se repitió 2 veces más, tras lo cual los volúmenes obtenidos se mezclaron, añadiéndose Na₂SO₄ en exceso para eliminar el agua arrastrada. A continuación, se procedió a la evaporación del diclorometano hasta sequedad en un rotavapor a 42 °C.

C₃-Capítulo 3

El residuo se resuspendió en diclorometano y se transfirió a viales para cromatografía de gases. Posteriormente el diclorometano se evaporó nuevamente empleando un SpeedVac, a 36 °C y durante 3 horas.

El residuo final se disolvió en 100 µl de BSTFA (N,O bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) y 10 µl de piridina y los trimetil-silil derivados se analizaron en un equipo de GC-MS (Thermo Finnigan).

El análisis de las muestras anteriormente obtenidas se realizó en la Unidad de Técnicas Cromatográficas de los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidad de Coruña, con un cromatógrafo Thermo Finnigan Trace GC, equipado con una columna DB-XLB, J&W, de 60 m x 0,25 mm de diámetro interno, usando helio como gas portador a un flujo constante de 1 ml min⁻¹. El programa de temperatura fue desde 90 °C hasta 270 °C, a una velocidad de 5 °C min⁻¹. El cromatógrafo se acopló a un detector de masas Thermo Finnigan Polaris Q, que trabajó con una intensidad de impacto electrónico de 70 eV.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo tal y como se detalló en el apartado C₂ 3.10.3 del Capítulo 2.

C₃ 3.4. Ensayos del comportamiento mecánico

El comportamiento mecánico de las plantas se estudió mediante ensayos de tracción sometiendo a las plantas a distintas sollicitaciones mecánicas.

Para ello se empleó una máquina universal de ensayos Instron 5566 que 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, a temperatura ambiente. Las principales especificaciones técnicas de la Instron 5566 son las que se detallan a continuación.

Capacidad de carga 500 N

Rango de velocidades 0,005 a 500 mm/min

Recorrido total de la cruceta 1135 mm

Precisión de la medida de la carga ± 0,01 % de la escala

En un ensayo típico de tracción, los datos de tensión (σ) y deformación (ϵ), obtenidos mientras se realiza el ensayo a una temperatura y velocidad constante, suelen

representarse en un diagrama cartesiano. Se obtienen 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 es aplicada uniaxialmente a lo largo del tallo de la planta.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo tal y como se detalló en el apartado C₂ 3.10.3 del Capítulo 2.

C₃ 3.5. Biometrías

Las plantas de tabaco se crecieron en tierra, y desde semillas, en una cámara de cultivo con un régimen de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C.

Se tomaron medidas de la longitud de su tallo cada 3 días, hasta el momento del cese de su crecimiento en longitud. También se registró el momento del inicio de la floración y el diámetro final del tallo para cada planta.

C₃ 4. Resultados y discusión

C₃ 4.1. Efecto de la presencia de la peroxidasa 73 (VviPrx73) sobre el contenido en ligninas de las plantas de tabaco transgénicas

Empleando el método del bromuro de acetilo (Iiyama y Wallis, 1988), se cuantificó el contenido en ligninas de las paredes celulares obtenidas a partir de tallos de las líneas de tabaco transgénicas.

Como puede observarse en la **Figura C₃ 1**, los tallos de todas las líneas transgénicas (L2, L6, L19) mostraron un valor medio del porcentaje en ligninas superior al de los tallos de las plantas control, sin embargo este incremento no es estadísticamente significativo.

Este ligero aumento en el contenido en ligninas de las paredes de las plantas transgénicas, en comparación con las paredes de las plantas control, respalda la hipótesis de la implicación de VviPrx73 en el proceso de lignificación. Además, el hecho de que las diferencias no sean estadísticamente significativas no resulta extraño. Las peroxidases de clase III participan en la formación de las ligninas mediante la oxidación de los monolignoles, para su posterior polimerización, lo que constituye el último paso en la ruta de síntesis de estos polímeros (Boudet *et al.*, 1995; Ros Barceló, 1997; Boerjan *et al.*, 2003). Por ello, cabe esperar que la introducción de una nueva peroxidasa no produzca más que un ligero aumento en el contenido en ligninas de esas plantas, tal y como muestran estos resultados, dado que al no modificarse adicionalmente pasos anteriores de la ruta es muy posible que se produzcan restricciones por la falta de sustratos (monolignoles).

La biosíntesis de ligninas es un proceso altamente controlado, dado que para la planta es metabólicamente muy costoso al requerir grandes cantidades de esqueletos de carbono y equivalentes reductores (Amthor, 2003). Además, las plantas no poseen un mecanismo para degradar las ligninas (Lewis y Yamamoto, 1990), por tanto, los carbonos invertidos en la biosíntesis de estos polímeros no podrán ser recuperados, convirtiendo a las células lignificadas en un importante sumidero de carbono no recuperable (Patzlaff *et al.*, 2003). Esto obliga a las plantas a establecer un cuidadoso balance entre la síntesis de ligninas y la disponibilidad de recursos, regulando fuertemente la ruta de biosíntesis de los monolignoles (Patzlaff *et al.*, 2003). Todo ello respaldaría que en las plantas de tabaco transgénicas, a pesar de mostrar una mayor actividad peroxidasa frente a los

sustratos de lignificación en su apoplasto, no se hubiesen producido alteraciones en la síntesis de monolignoles, limitando de este modo la síntesis de ligninas, ya que se trata de un proceso muy costoso para las plantas y en condiciones normales un mayor contenido en ligninas no les reporta ningún beneficio.

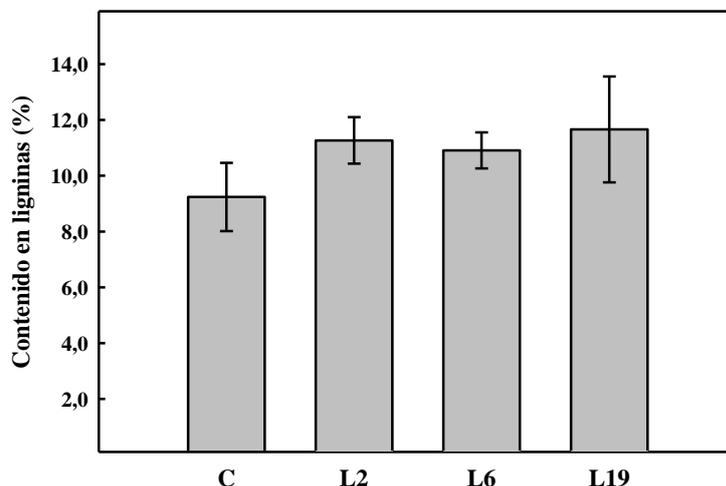


Figura C₃ 1.- Contenido en ligninas (%) de las paredes celulares de los tallos de tabaco. En la gráfica se representan la media y desviación estándar (barras de error) calculadas con los valores obtenidos del ensayo por sextuplicado de tres réplicas biológicas para cada línea y control. El análisis de la varianza (ANOVA) de estos datos reveló que no existen diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre el contenido en ligninas de las líneas transgénicas y el del control.

C: control L2: línea transgénica 2 L6: línea transgénica 6 L19: línea transgénica 19

C₃ 4.2. Alteraciones a nivel histológico asociadas a la presencia de VviPrx73

Tras observar que la presencia de VviPrx73 no provoca cambios significativos en el contenido en ligninas de los tallos, se visualizó la deposición de este polímero en las paredes de los diferentes tipos celulares en secciones transversales de tallo. Para ello se recurrió al empleo de la tinción de Wiesner, que revela los *O*-4-hidroxicinamil aldehídos terminales contenidos en las ligninas (Pomar *et al.*, 2002b), y de la de Mäule, específica para grupos siringilo (Ros Barceló *et al.*, 2000).

La **Figura C₃ 2** muestra secciones transversales de tallos sometidas a la tinción de Wiesner. En ellas se puede observar que no existen diferencias apreciables entre las plantas control y las plantas transgénicas, ni en cuanto al área teñida, ni en cuanto a la intensidad de la tinción. Tampoco se observan diferencias en la tinción de las paredes de los distintos tipos celulares entre plantas control y transgénicas.

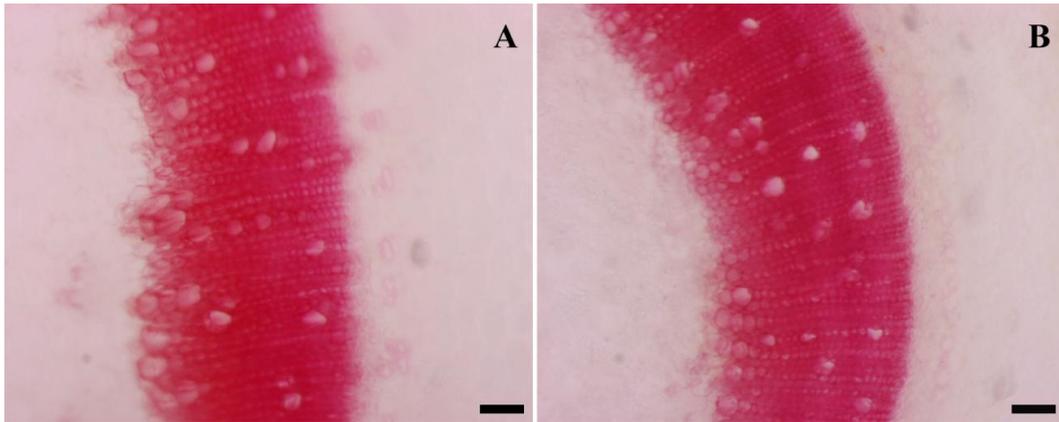


Figura C₃ 2.- Secciones transversales de tallos de tabaco sometidas a la tinción de Wiesner. A: control. B: línea transgénica 2. Las barras corresponden a 100 μ m.

En cuanto a la tinción de Mäule, tampoco reveló diferencia alguna entre las secciones del tallo de las plantas control y las de las plantas transgénicas (**Figura C₃ 3**).

Estos resultados concuerdan con los del apartado anterior, donde se apreciaba que si bien la presencia de VviPrx73 provoca un aumento en el contenido en ligninas, se trata de un incremento ligero (no estadísticamente significativo), a tal punto que no es perceptible mediante el empleo de estas tinciones.

Las secciones de tallo sometidas a las tinciones de Wiesner y de Mäule también permitieron observar que no existen diferencias apreciables en la deposición de las ligninas a nivel espacial entre las plantas control y las transgénicas.

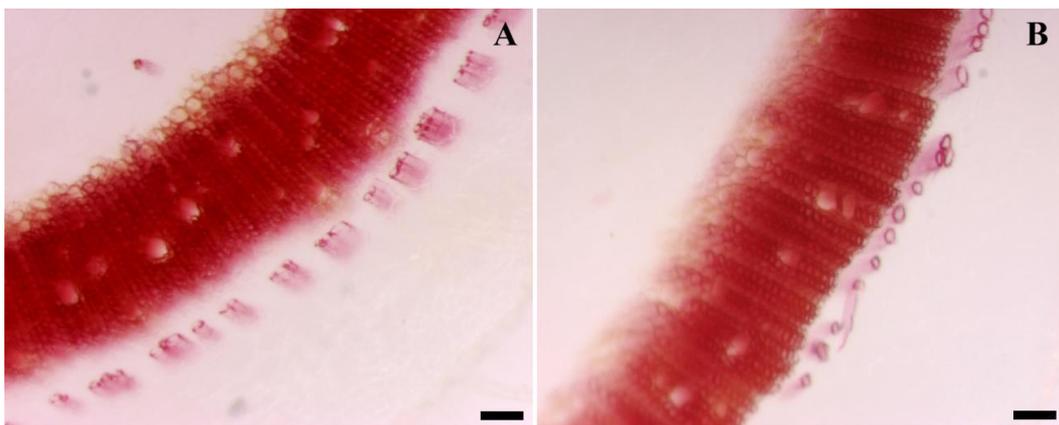


Figura C₃ 3.- Secciones transversales de tallos de tabaco sometidas a la tinción de Mäule. A: control. B: línea transgénica 2. Las barras corresponden a 100 μ m.

C₃ 4.3. Análisis de la composición de las ligninas mediante oxidación con nitrobenzeno y tioacidolisis

Hasta este momento se ha constatado que la presencia de VviPrx73 provoca un ligero incremento en el contenido en ligninas de las líneas transgénicas, si bien este no llega a ser significativamente diferente al contenido en ligninas de las plantas control.

El siguiente paso consistió en el análisis de la composición monomérica de las ligninas de estas plantas utilizando dos métodos degradativos diferentes, la oxidación en medio alcalino con nitrobenzeno y la tioacidolisis, debido a la complementariedad de los resultados que proporciona cada uno de ellos.

La oxidación en medio alcalino usando nitrobenzeno es un proceso agresivo capaz de romper no solo enlaces débiles en las ligninas, sino también enlaces fuertes. Esta reacción da como productos de la degradación los aldehídos fenólicos siringaldehído, vanillina y *p*-hidroxibenzaldehído. Sin embargo, tiene el problema de acortar las cadenas laterales de las ligninas y no proporciona información alguna sobre sus grupos funcionales, ni sobre sus interconexiones. Además con muestras suberizadas existe un alto riesgo de interferencia entre las ligninas y otros fenoles de pared que derivan en productos similares.

Por su parte, la tioacidolisis es una despolimerización ácida, que actúa mediante la escisión de los enlaces β -O-4. El método combina la acción de un ácido fuerte, el boro trifluoruro-éter dietílico, y un nucleófilo, el etanotiol. Solo las unidades de ligninas implicadas en subestructuras arilglicerol- β -aril éter, muy abundantes en las ligninas nativas, proporcionan monómeros fenilpropano C₆C₃ con las cadenas laterales tioetiladas. Como la tioacidolisis degrada las ligninas a estructuras que mantienen características de las cadenas originales, la determinación de los monómeros obtenidos y sus cantidades permiten obtener gran cantidad de información sobre los grupos funcionales y la estructura de las ligninas. Los grupos benzaldehído, cinamaldehído y cinamil alcoholes implicados en enlaces β -O-4 pueden ser estimados a partir de sus productos específicos de degradación. Sin duda, la más importante limitación de la tioacidolisis es su aplicación a ligninas con baja proporción de enlaces β -O-4, ya que los resultados obtenidos difícilmente podrían ser extrapolables al conjunto del polímero. En estos casos el uso complementario de la oxidación con nitrobenzeno constituye una herramienta muy útil.

Como muestra la **Figura C₃ 4**, que refleja los datos obtenidos mediante el método de la oxidación en medio alcalino con nitrobenzeno, solo existen diferencias significativas en cuanto a la composición de las ligninas entre la línea transgénica 2 y el control. Las ligninas de esta línea poseen un mayor porcentaje de grupos G y un menor porcentaje de grupos S que el control (**Figura C₃ 4A**), de modo que la relación G/S es significativamente mayor en la línea 2 que en el control (**Figura C₃ 4B**).

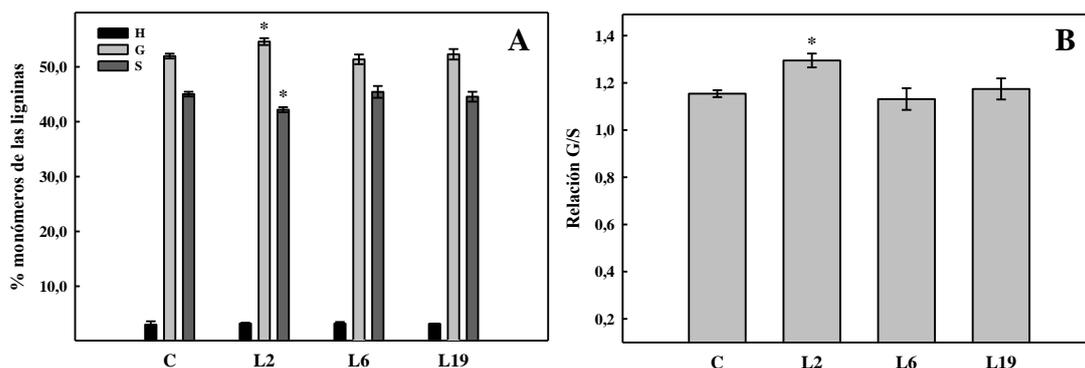


Figura C₃ 4.- Datos obtenidos del análisis de las paredes celulares de tallos de tabaco mediante oxidación en medio alcalino con nitrobenzeno. A: porcentaje de grupos G (G), H (H) y S (S) en las ligninas de cada línea. B: relación entre el porcentaje de grupos G y el de grupos S en las ligninas de cada línea. En las gráficas se representan la media y desviación estándar (barras de error) calculadas con los valores obtenidos del ensayo por duplicado de tres réplicas biológicas para cada línea y control. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto al control.

C: control L2: línea transgénica 2 L6: línea transgénica 6 L19: línea transgénica 19

Estos datos aparecen reflejados en la **Tabla C₃ 1**, donde también se incluye la relación H:G:S en las distintas líneas, pudiendo observarse que la proporción de unidades H es la misma en las líneas transgénicas y en el control.

Tabla C₃ 1. Composición de las ligninas de los tallos de tabaco determinada mediante oxidación en medio alcalino con nitrobenzeno.

	Relación H:G:S	Relación G/S	Productos de oxidación alcalina con nitrobenzeno ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PC)		
			<i>p</i> -HBA (H)	Vanilina (G)	Siringaldehído (S)
Control	3:52:45	1,154 \pm 0,015	0,336 \pm 0,034	7,329 \pm 0,857	7,603 \pm 0,884
Línea 2	3:55:42	1,295 \pm 0,029	0,438 \pm 0,064	9,347 \pm 1,834	8,623 \pm 1,516
Línea 6	3:51:46	1,131 \pm 0,046	0,426 \pm 0,031	8,589 \pm 1,233	9,113 \pm 1,496
Línea 19	3:52:45	1,174 \pm 0,045	0,454 \pm 0,078	9,374 \pm 1,252	9,601 \pm 1,672

Los resultados corresponden a la media \pm la desviación estándar obtenidas del ensayo por duplicado de tres réplicas biológicas para cada línea y control

PC: pared celular

Atendiendo a los datos de $\mu\text{g mg}^{-1}$ PC (pared celular) de los productos de oxidación que se muestran en la **Tabla C₃ 1**, se constatan los resultados de la cuantificación de las

ligninas por el método del bromuro de acetilo, que indicaban un ligero aumento del contenido en ligninas en las líneas transgénicas respecto del control. Así, teniendo en cuenta los resultados obtenidos del ensayo de oxidación en medio alcalino con nitrobenzeno, la suma de los tres tipos de monómeros es de 15,268 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PC en el control y de 18,408 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PC, 18,128 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PC y 19,429 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PC en las líneas transgénicas 2, 6 y 19, respectivamente.

Por su parte, la degradación de las ligninas mediante tioacidólisis dio como resultado los productos que se muestran en las **Figuras C₃ 5A y C₃ 5B**. El empleo de un estándar interno (tetracosano) permitió, a la hora de cuantificar los productos de degradación, obviar las fluctuaciones en la cantidad de cada uno de ellos debidas a diferencias en la eficiencia de las extracciones.

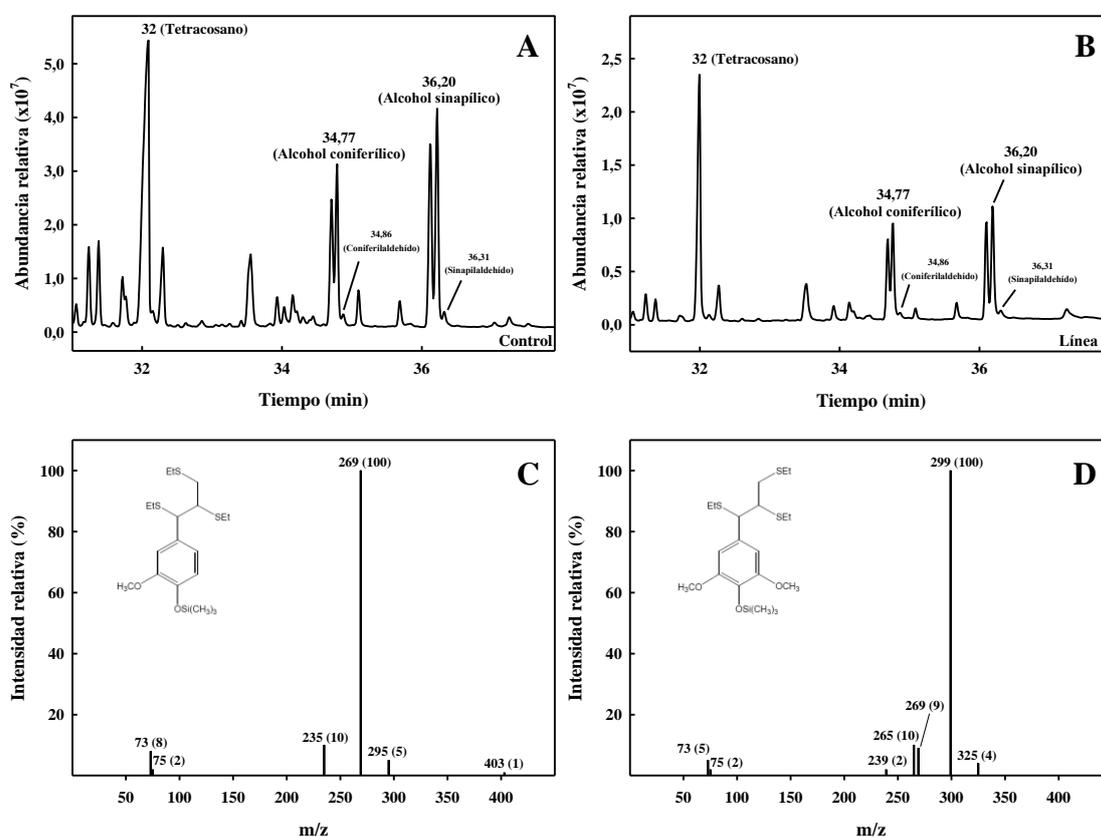


Figura C₃ 5.- Productos de degradación, mediante tioacidólisis, de las ligninas de paredes celulares de tallos de *N. tabacum*. En las figuras A y B se muestran los perfiles de la cromatografía de gases de los productos de degradación de las ligninas de una planta control y de una de la línea transgénica 2, respectivamente. Se indican los picos correspondientes a los productos de degradación de las ligninas identificados y al estándar interno (tetracosano), así como su tiempo de retención. En las figuras C y D se muestran los espectros de masas de los monómeros tioetilados que surgen de las estructuras aril-glicerol- β -aril éter (β -O-4) derivadas de los alcoholes coniferílico y sinapílico, respectivamente, en las ligninas de tallos de *N. tabacum*.

En la **Tabla C₃ 2** se muestran los valores de tiempo de retención (tr) y espectro de masas para cada uno de los productos de tioacidolisis identificados.

Tabla C₃ 2. Productos de degradación, mediante tioacidolisis, de las ligninas de paredes celulares de tallos de *N. tabacum*.

tr (min)	m/z (intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
34,77	418(0), 403(1), 295(5), 269 (100), 235(10), 75(2), 73(8)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
34,86	418(0), 403(5), 283(66), 222(100), 192(32), 135(42), 75(18), 73(50)	Coniferilaldehído unido por enlaces β-O-4
36,2	325(4), 299(100), 269(9), 265(10), 239(2), 75(2), 73(5)	Alcohol sinapílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
36,31	433(3), 313(49), 252(100), 222(28), 135(23), 75(12)	Sinapilaldehído unido por enlaces β-O-4

En la **Figura C₃ 6** se pueden observar los resultados obtenidos del análisis de la composición de las ligninas mediante tioacidolisis.

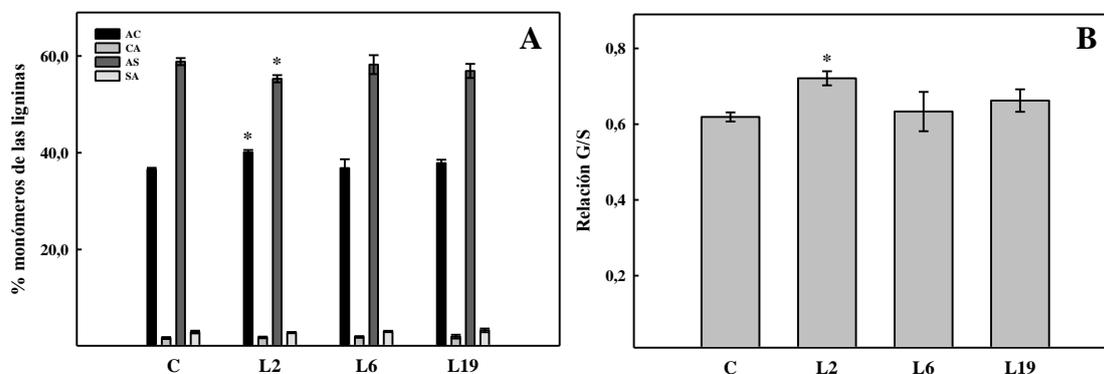


Figura C₃ 6.- Datos obtenidos del análisis de las paredes celulares de tallos de tabaco mediante tioacidolisis. A: porcentaje de alcohol coniferílico (AC), coniferilaldehído (CA), alcohol sinapílico (AS) y sinapilaldehído (SA) en las ligninas de cada línea. B: relación entre el porcentaje de grupos G y de grupos S en las ligninas de cada línea. En las gráficas se representan la media y desviación estándar (barras de error) calculadas con los valores obtenidos del ensayo por duplicado de tres réplicas biológicas para cada línea y control. Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0,05) respecto al control.

C: control L2: línea transgénica 2 L6: línea transgénica 6 L19: línea transgénica 19

Estos muestran que las ligninas de la línea transgénica 2 poseen un mayor porcentaje de alcohol coniferílico y un menor porcentaje de alcohol sinapílico que las ligninas de los controles (**Figura C₃ 6A**), siendo estadísticamente significativa esta diferencia. Así, el

cociente de G/S es significativamente mayor en la línea 2 que en las plantas control (**Figura C₃ 6B**). En cuanto a las demás líneas transgénicas, no muestran diferencias en la composición de sus ligninas respecto del control.

Estos datos concuerdan con los resultados del análisis por oxidación con nitrobenzeno, reflejando que la única línea transgénica cuya composición de las ligninas difiere de la de los controles es la línea 2.

En la **Tabla C₃ 3** se recoge la cantidad ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PC) de cada uno de los productos de degradación de las ligninas obtenidos mediante tioacidolisis. Como puede observarse, estos datos corroboran, al igual que lo hicieron los obtenidos mediante oxidación con nitrobenzeno, que el contenido en ligninas de las líneas transgénicas es ligeramente superior al de las plantas control. Así, el sumatorio de productos de degradación de las ligninas para los controles es de $68,776 \mu\text{g mg}^{-1}$ PC y para las líneas transgénicas 2, 6 y 19 de $73,815 \mu\text{g mg}^{-1}$ PC, $78,224 \mu\text{g mg}^{-1}$ PC y $80,340 \mu\text{g mg}^{-1}$ PC, respectivamente.

Tabla C₃ 3. Composición de las ligninas de los tallos de tabaco determinada mediante tioacidolisis.

	Productos de degradación de las ligninas obtenidos mediante tioacidolisis ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PC)			
	CAlc	CAlD	SAlc	SAlD
Control	25,123 \pm 3,424	1,179 \pm 0,294	40,455 \pm 5,160	2,019 \pm 0,413
Línea 2	29,601 \pm 3,333	1,342 \pm 0,235	40,799 \pm 3,544	2,073 \pm 0,284
Línea 6	28,902 \pm 4,360	1,496 \pm 0,291	45,441 \pm 3,659	2,385 \pm 0,337
Línea 19	30,346 \pm 5,142	1,595 \pm 0,390	45,764 \pm 8,855	2,635 \pm 0,486

Los resultados corresponden a la media \pm la desviación estándar obtenidas del ensayo por duplicado de tres réplicas biológicas para cada línea y control. En la realización de estos cálculos se consideró para los grupos G un factor de respuesta de 0,47 y para los grupos S de 0,53 (**Yue et al., 2012**).

PC: pared celular CAlc: alcohol coniferílico CAlD: coniferilaldehído SAlc: alcohol sinapílico SAlD: sinapilaldehído

En resumen, los datos obtenidos mediante estas dos técnicas degradativas apuntan a que no existen diferencias en la composición de las ligninas entre las líneas transgénicas 6 y 19 y las plantas control. Sin embargo, las ligninas de la línea transgénica 2 poseen una relación G/S significativamente mayor a la de las ligninas de las plantas control.

El que no existan diferencias cualitativas entre las ligninas de las líneas 19 y 6 respecto del control era predecible, teniendo en cuenta los datos de actividad peroxidasa incluidos en el apartado C₂ 4.5. del Capítulo 2, que mostraban que la relación entre la actividad coniferil-peroxidasa y la actividad sinapil-peroxidasa en el apoplasto de las plantas transgénicas era la misma a la registrada en el apoplasto de las plantas control.

Los resultados del análisis cuantitativo y cualitativo de las ligninas de los transformantes, junto con los obtenidos en el Capítulo 2 mediante isoelectroenfoque y ensayos enzimáticos de los extractos apoplásticos de estas plantas, concuerdan con la situación reflejada por **Lin et al. (2016)** en su trabajo. Estos autores indican que líneas de *Populus trichocarpa* Torr. y A. Gray ex. Hook. en que se había silenciado el gen de la peroxidasa PtrPO21 (peroxidasa de xilema) muestran una reducción en su contenido en ligninas, pero estas mantienen el mismo *ratio* G/S que en las plantas control. Además detectan que estas plantas transgénicas responden al silenciamiento de *PtrPO21* con la sobreexpresión de *PtPrx35*, que codifica para una peroxidasa de clase III abundante en xilema.

Se refuerza así la hipótesis planteada en el Capítulo 2, acerca de la existencia de un mecanismo de respuesta de las plantas transgénicas a la presencia de VviPrx73, consistente en la reprogramación de la expresión de genes de peroxidasa endógenos, con el objetivo de mantener inalterada la composición de sus ligninas y, así pues, las propiedades de las paredes celulares.

Sorprende, sin embargo, que las ligninas de las plantas de la línea 2 posean una relación G/S superior a la de las ligninas de las plantas control. Este resultado podría deberse a diferencias en la disponibilidad de los monolignoles en el apoplasto de la línea 2, en comparación con las demás líneas.

Observando las **Figuras C₃ 4 y C₃ 6** se puede apreciar que el porcentaje de grupos G en las ligninas de las plantas de la línea 2 es superior al registrado en las ligninas de las plantas control, mientras que el porcentaje de grupos S en las ligninas de esta línea es inferior al de los controles. Sin embargo, en el caso de las líneas transgénicas 6 y 19, ni el porcentaje en grupos G ni el porcentaje en grupos S de sus ligninas difiere del de los controles. Estas diferencias observadas en la línea 2 no solo son el resultado de un mayor contenido en grupos G en comparación con el control (**Tablas C₃ 1 y C₃ 3**), sino también de que el contenido en grupos S de la línea 2 apenas difiere del de las plantas control, siendo el menor de las tres líneas transgénicas (**Tablas C₃ 1 y C₃ 3**). Esto contrasta con los datos de actividad peroxidasa en el apoplasto de estas líneas transgénicas (apartado C₂ 4.5. del Capítulo 2), que señalan que la línea con la menor actividad sinapil-peroxidasa es la 6. En cuanto al contenido en grupos G, sí existe una correspondencia entre este valor y la actividad coniferil-peroxidasa en cada una de las líneas, de modo que el orden de mayor actividad coniferil-peroxidasa, y contenido en grupos G, a menor es el siguiente: línea 19>línea 2>línea 6.

Estos datos podrían ser indicativos de una menor disponibilidad del monolignol alcohol sinapílico en el apoplasto de las plantas de la línea transgénica 2, respecto a la disponibilidad de este monómero en el resto de líneas transgénicas, y esta podría ser la causa de que tan solo las ligninas de la línea 2 muestren una relación G/S significativamente diferente a la de los controles.

Que existan diferencias entre líneas transgénicas obtenidas mediante el mismo procedimiento y empleando las mismas construcciones de ADN no es algo extraño. Esto puede ser debido a algún tipo de alteración en el parental de la línea durante el proceso de regeneración a partir del material vegetal transformado, o bien la causa puede estar en la localización del genoma donde se insertó el ADN-T (ADN transferido), dado que esta es al azar, pudiendo provocar alteraciones en secuencias de la propia planta que lleven a modificaciones en las características del vegetal (**Zolla et al., 2008; Rischer y Oksman-Caldentey, 2006; Schnell et al., 2015**).

C₃ 4.4. Análisis de la composición de las paredes mediante espectroscopía FTIR

El siguiente paso en este estudio consistió en el análisis de la composición de las paredes celulares mediante espectroscopía FTIR, con el objetivo de observar posibles diferencias entre las líneas transgénicas y los controles, sobre todo en lo que respecta a los carbohidratos de pared.

La espectroscopía FTIR constituye una poderosa herramienta para el análisis de los componentes de la pared, siendo además una técnica rápida y no destructiva (**Alonso-Simón et al., 2011**). En el estudio de la composición de las paredes celulares, la zona del espectro de absorción que más información proporciona es la que abarca de los 800 cm⁻¹ a los 1800 cm⁻¹. Esta región consiste en muchas bandas superpuestas asignadas a las vibraciones de los grupos pertenecientes a las ligninas y a los carbohidratos (**Bui et al., 2015; Poletto et al., 2012; Popescu et al., 2009**).

Observando las **Figuras C₃ 7 y C₃ 8** se puede apreciar que a determinados números de onda existen diferencias entre los espectros de absorción de las paredes celulares de las líneas transgénicas y de las plantas control. Así, la absorbancia relativa de las bandas en torno a los 1600 cm⁻¹ y 1510 cm⁻¹, que corresponden a vibraciones del anillo aromático de las ligninas (**Bui et al., 2015**), es mayor en las líneas transgénicas. En concreto, la intensidad de la banda en torno a los 1510 cm⁻¹ cobra importancia a la hora de conocer

el contenido total de ligninas, dado que esta banda surge únicamente debido a la vibración del esqueleto aromático del anillo bencénico en las ligninas, mientras que la banda en torno a 1600 cm^{-1} tiene también contribuciones del grupo C=O conjugado (Pandey, 1999; Zhou *et al.*, 2011; Bui *et al.*, 2015).

Lo mismo ocurre en torno a los 1735 cm^{-1} , banda asignada a grupos éster en la fracción hemicelulósica (Bui *et al.*, 2015). Algunos autores señalan que una banda prominente en esta región es un indicativo de un mayor contenido en carbohidratos de pared (Poletto *et al.*, 2012; Pandey, 1999).

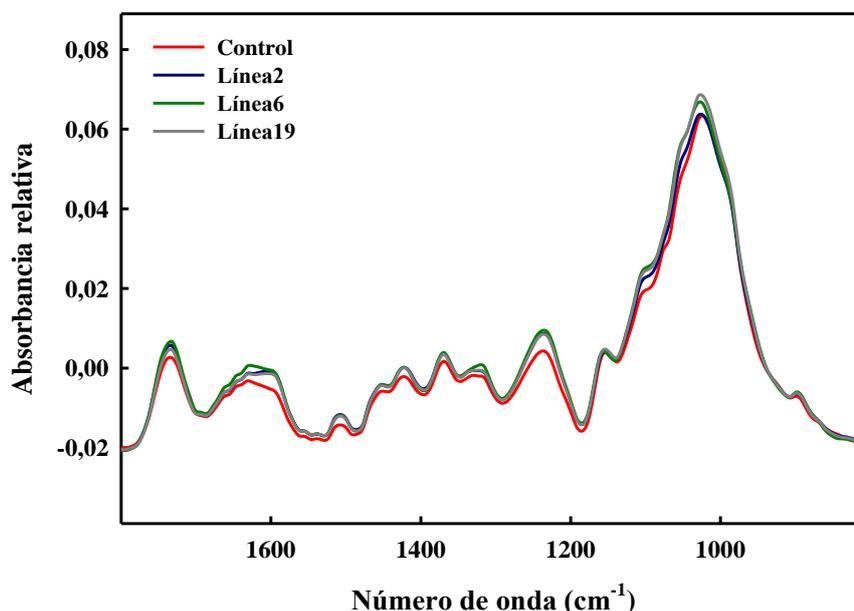


Figura C₃ 7.- Espectros de absorción de las paredes celulares de tallos de tabaco obtenidos mediante espectroscopía FTIR. En cada color se muestra el espectro medio resultado del ensayo por duplicado de tres réplicas biológicas para cada línea y control.

En torno a los 1230 cm^{-1} la absorbancia relativa también es mayor en las líneas transgénicas que en el control (Figuras C₃ 7 y C₃ 8). Dorado *et al.* (2001) indican la importancia de la intensidad de la banda a 1230 cm^{-1} para predecir el contenido de carbohidratos de pared en *Cannabis sativa* L., señalando que es un buen índice del enriquecimiento en estos polímeros.

Las bandas en torno a los 1100 cm^{-1} y 1053 cm^{-1} , relacionadas con las celulosas (McCann *et al.*, 2007; Zenoni *et al.*, 2004), también muestran una mayor absorbancia relativa en las líneas transgénicas. Sin embargo, en torno a los 991 cm^{-1} , banda asociada igualmente a las celulosas (Schindelman *et al.*, 2001), la absorbancia relativa es mayor en el control que en las líneas transgénicas 6 y 2 (Figuras C₃ 7 y C₃ 8). Como muestran

las **Figuras C₃ 7 y C₃ 8**, en la región del espectro que abarca estas bandas se pueden observar notables diferencias en la absorbancia de las paredes de las tres líneas transgénicas.

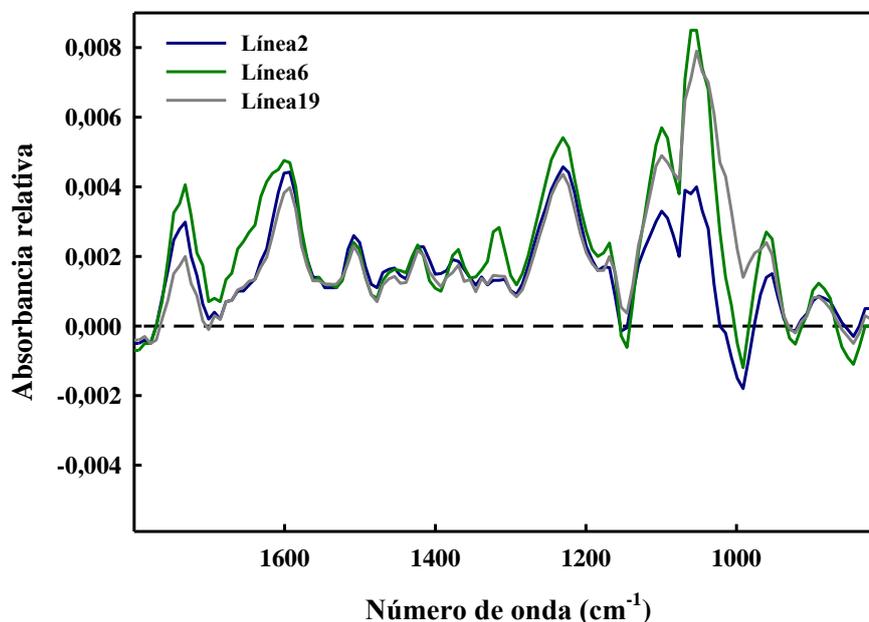


Figura C₃ 8.- Espectros diferenciales, obtenidos restando al espectro de absorción medio de las paredes celulares de cada línea transgénica (línea 2, línea 6 y línea 19) el espectro de absorción medio de las paredes celulares de las plantas control.

De los 950 cm^{-1} a los 1200 cm^{-1} se localizan múltiples bandas asignadas a las celulosas, se trata de bandas $\nu_{\text{C-O}}$ que son principalmente debidas a modos de extensión C-O en grupos alcohólicos COH junto con aquellas de los C-O intra- y extra-cíclicos de los grupos acetal O-C-O-C (Maréchal y Chanzy, 2000). Sin embargo, en esta región del espectro también se localizan bandas que surgen de las vibraciones en otros polisacáridos de pared distintos a las celulosas (Kačuráková *et al.*, 2000), lo que dificulta la interpretación de los picos observados a estos números de onda. De este modo, en la literatura pueden encontrarse tanto trabajos en que relacionan la intensidad de estas bandas con el contenido en celulosas (Feraru *et al.*, 2011; Fagard *et al.*, 2000; Daras *et al.*, 2009), como trabajos en que lo hacen con el contenido en polisacáridos de pared (celulósicos y no celulósicos) (Pozo *et al.*, 2016).

Otra dificultad añadida a la interpretación de estas bandas viene dada por el hecho de que varias corresponden a las vibraciones de diferentes alcoholes de las celulosas y de sus distintas conformaciones. Los estudios de Maréchal y Chanzy (2000) sobre la celulosa I β de *Valonia ventricosa* J. Agardh señalan que varias de las bandas observadas

a estos números de onda son debidas a las distintas conformaciones de los alcoholes (**Figura C₃ 9**). Así por ejemplo, encuentran que los alcoholes primarios muestran tres conformaciones, a las que se asocian sus respectivas bandas ν_{C-O} , que son las siguientes: la banda en torno a los 1000 cm^{-1} corresponde a la conformación secundaria (II); la banda en torno a 1015 cm^{-1} es asignada a la conformación menor (III); la banda en torno a 1035 cm^{-1} corresponde a la conformación dominante (I). En este caso, las distintas intensidades de estas bandas son un indicativo de la cantidad aproximada de alcoholes primarios que adoptan una cierta conformación, y la conformación en que se encuentren los alcoholes primarios influye en los enlaces de hidrógeno de la celulosa. A mayores, los autores apuntan a que los picos en torno a 1060 cm^{-1} corresponden a ν_{C-O} de alcoholes secundarios C3-O3H y en torno a 1115 cm^{-1} a ν_{C-O} de alcoholes secundarios C2-O2H.

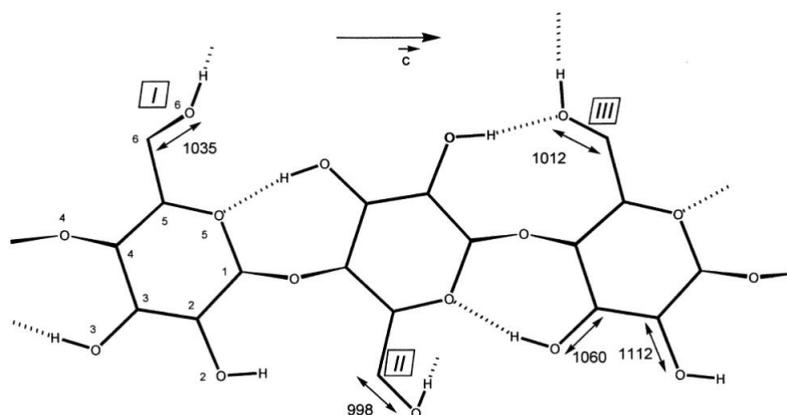


Figura C₃ 9.- Asignación de las bandas de infrarrojos correspondientes a vibraciones en la red de enlaces de hidrógeno de la celulosa I_β de *Valonia ventricosa*. En la figura se muestran las tres conformaciones de los alcoholes primarios (I, II y III) y también las bandas de extensión, que aparecen como flechas con dos puntas. Imagen modificada de **Maréchal y Chanzy (2000)**.

Los picos observados a 1099 cm^{-1} y 1053 cm^{-1} , y la caída en la absorbancia relativa que se aprecia a 991 cm^{-1} en los espectros de absorción (**Figuras C₃ 7 y C₃ 8**), podrían corresponder a las bandas ν_{C-O} de alcoholes que indican Maréchal y Chanzy, dado que el número de onda que señalan estos autores para cada una de ellas puede variar ligeramente al tratarse de otra especie y dependiendo del estado de desarrollo de la pared (**Cintrón y Hinchliffe, 2015**). De modo que las diferencias en su intensidad en los espectros de las tres líneas transgénicas podrían responder a diferencias cualitativas en sus celulosas.

Sin embargo, la complejidad de la interpretación de las bandas de esta región del espectro no permite discernir si las diferencias en la absorbancia relativa a 1099 cm^{-1} ,

1053 cm⁻¹ y 991 cm⁻¹, en los espectros de las tres líneas transgénicas, son un indicativo de diferencias en el contenido en celulosas y/o en polisacáridos no celulósicos, o responden a algún cambio en la estructura, los grupos o los enlaces de estos polímeros.

Por ejemplo, **Liu et al. (2011)** en su estudio de fibras de algodón (*Gossypium* spp.) mediante espectroscopía FTIR observaron diferencias en la región 950 cm⁻¹-1200 cm⁻¹ entre el espectro de las fibras maduras y el de las inmaduras. Estos autores vieron que la intensidad de las bandas a 1032 cm⁻¹ y 1054 cm⁻¹ era mayor en el espectro de las fibras inmaduras, sin embargo, la intensidad de la banda a 956 cm⁻¹ era mayor en el de las fibras maduras. Con la maduración el contenido de celulosas de las fibras de algodón aumenta, sin embargo, los autores observaron que no todas las bandas asignadas a este polímero poseían una mayor intensidad en el espectro de las fibras maduras. Así pues, en este caso parece que la intensidad de estas bandas no es un mero indicador del contenido en celulosas sino que está aportando datos bien sobre otros compuestos de la pared, bien sobre cambios cualitativos en las celulosas.

Tras observar las diferencias que existen entre los espectros de las paredes de las tres líneas transgénicas y del control, y dada la dificultad de la interpretación de los resultados, estos datos fueron sometidos a un análisis de componentes principales. Con esto se buscó establecer grupos que clasificaran a las paredes de las distintas plantas según sus características y conocer cuáles son esas características que las diferencian.

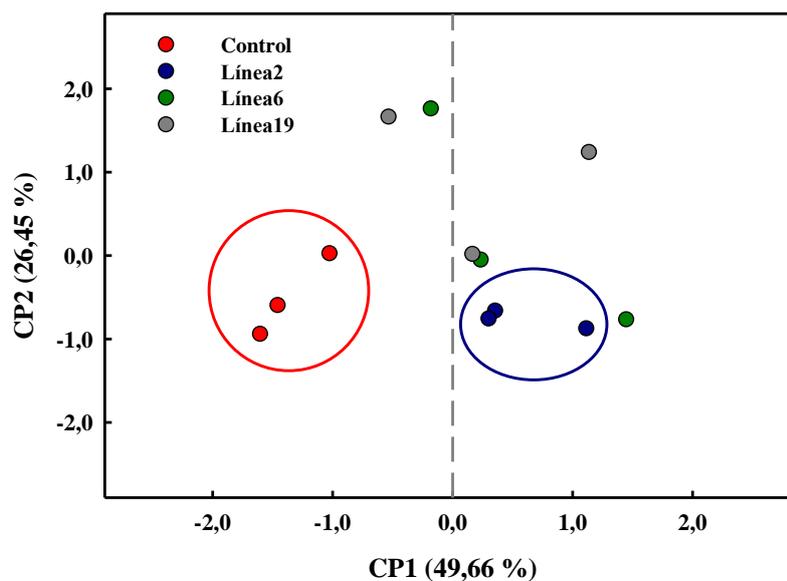


Figura C₃ 10.- Análisis de componentes principales de los espectros de absorción obtenidos mediante espectroscopía FTIR. Se representa el valor del componente principal 1 (CP1) frente al valor del componente principal 2 (CP2), para las paredes de tres plantas control y para las paredes de tres plantas de cada una de las tres líneas transgénicas (líneas 2, 6 y 19).

En la **Figura C₃ 10** se representa el valor del componente principal 1 (CP1) frente al valor del componente principal 2 (CP2), para las paredes de cada planta. El CP1 explica un 49,66 % de la variabilidad entre espectros, mientras que el CP2 explica un 26,45 %. En esta figura puede observarse que las paredes de las plantas control y las de las plantas de la línea transgénica 2 aparecen englobadas en dos grupos diferentes. Esto indica que las paredes de las plantas de la línea 2 comparten entre sí características, al igual que las de las plantas control, y difieren de las paredes de las demás plantas. En cuanto a las paredes de las plantas de la línea transgénica 19 y de la línea transgénica 6, no forman grupos definidos ni aparecen englobadas en el de la línea 2.

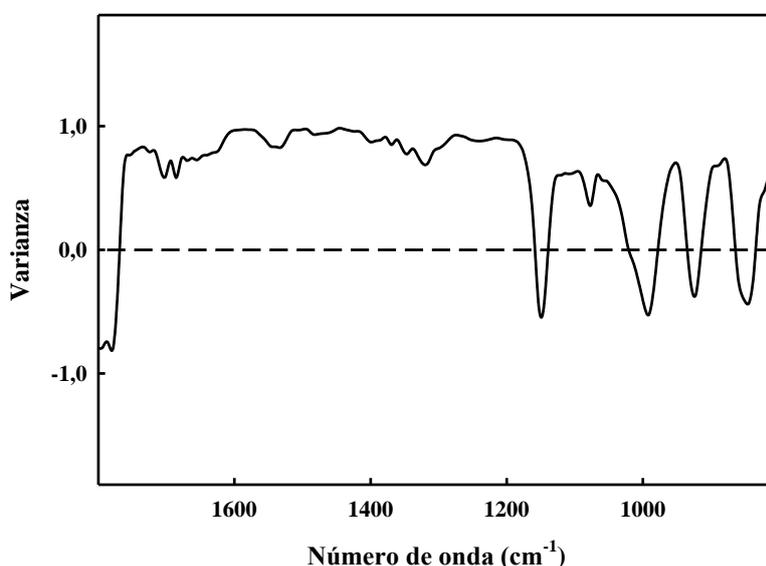


Figura C₃ 11.- Explicación de la variación entre los espectros de absorción por el componente principal 1 (CP1).

En la **Figura C₃ 11** se representa la explicación de la variación entre los espectros de absorción por el CP1, de tal modo que este gráfico permite conocer qué parámetros influyen en el valor del CP1 y cómo es esa influencia. Así, puede observarse que el valor del CP1 se ve influido fuertemente por el contenido en ligninas de la muestra, dado que para los números de onda correspondientes a las bandas asociadas a las ligninas, 1600 cm^{-1} y 1508 cm^{-1} , los valores de varianza son altos (0,966 y 0,969, respectivamente). Además, la relación entre ambos es positiva, de modo que una mayor absorción en estas regiones del espectro contribuye a valores mayores del CP1. El valor del CP1 también se ve influido por el contenido en carbohidratos de pared (para 1731 cm^{-1} la varianza es de 0,829 y para 1230 cm^{-1} de 0,886) y la relación es también positiva. Las diferencias en lo que respecta a las celulosas tienen una menor influencia,

para 1099 cm⁻¹ la varianza es de 0,629 y para 1053 cm⁻¹ de 0,557. Además, atendiendo a la intensidad de la banda a 991 cm⁻¹, su relación con el valor del CP1 es negativa (varianza de -0,527), de modo que una mayor absorbancia en esta banda contribuye a la disminución del valor del CP1. También existe una relación negativa entre el valor del CP1 y la intensidad de la banda de alrededor de los 1778 cm⁻¹. Esta banda corresponde a $\nu_{C=O}$ en ésteres (Bui *et al.*, 2015), que podrían relacionarse con la presencia de pectinas. En resumen, estos datos reflejan que son muchos los parámetros que influyen sobre el valor del CP1 y que ninguno de ellos ejerce una influencia especialmente relevante.

La agrupación de las paredes de las plantas de la línea transgénica 2 y de las control en dos conjuntos diferentes, cuando se representan los valores de CP1 y CP2 enfrentados (Figura C₃ 10), podría estar en parte motivada por las diferencias en la composición de las ligninas entre la línea transgénica 2 y los controles que revelaron los análisis del apartado C₃ 4.3.

Por otra parte, el hecho de que las paredes de todas las plantas transgénicas no aparezcan agrupadas en un mismo conjunto podría ser debido a las diferencias observadas en sus espectros medios de absorción (Figuras C₃ 7 y C₃ 8), que se hacen especialmente patentes en la región 950 cm⁻¹-1200 cm⁻¹.

Sin embargo, cabe resaltar que las paredes de todas las plantas transgénicas poseen valores del CP1 superiores a los de las paredes de las plantas control, y que mientras las paredes de todas las plantas control poseen valores del CP1 negativos, de las 9 plantas transgénicas 7 poseen valores del CP1 positivos y tan solo las paredes de 2 negativos. Esto podría estar revelando leves diferencias entre las paredes de los transformantes y las de las plantas control. De hecho, los espectros de absorción indican un mayor contenido en ligninas y carbohidratos de pared en los tabacos transgénicos respecto a los controles (Figuras C₃ 7 y C₃ 8).

Teniendo en cuenta los datos recogidos en este apartado, obtenidos del análisis de las paredes celulares mediante espectroscopía FTIR, se corrobora que el contenido en ligninas de las líneas transgénicas es ligeramente superior al de las plantas control. También parece ser mayor el contenido en carbohidratos de las paredes de los transformantes. Por otra parte, los espectros de absorción de las paredes de las líneas transgénicas difieren notablemente entre sí en la región que abarca de los 950 cm⁻¹ a los 1200 cm⁻¹. Esto podría indicar bien diferencias en el contenido de carbohidratos entre las tres líneas o bien diferencias en la composición en carbohidratos o en las características de estos polímeros.

C₃ 4.5. Caracterización de los transformantes a través del análisis de las propiedades mecánicas de sus tallos

Con el objetivo de comprobar si los tallos de los transformantes poseen las mismas propiedades mecánicas que los de las plantas control, se llevó a cabo el cálculo de su módulo E o módulo de Young. Este módulo es un indicador de la rigidez de los materiales. Cuanto mayor es el módulo de Young de un material mayor es su rigidez, y viceversa.

Como refleja el gráfico de la **Figura C₃ 12**, la línea transgénica 2 posee un módulo E significativamente menor al del control, lo que indica que los tallos de las plantas de esta línea son menos rígidos que los tallos de las plantas control. En lo que respecta a las líneas transgénicas 6 y 19, no presentan un módulo E significativamente diferente al del control.

Tanto los datos obtenidos mediante oxidación en medio alcalino con nitrobenzeno, como los que se obtuvieron mediante tioacidólisis (apartado C₃ 4.3.), señalaron que la única línea transgénica cuya composición de las ligninas es estadísticamente diferente a la de las plantas control es la línea 2, que posee un mayor *ratio* G/S. Esto concuerda con que dicha línea sea la única en presentar un módulo E diferente al de las plantas no transgénicas, sin embargo, dado el mayor *ratio* G/S de sus ligninas, se esperaría que también el valor del módulo E fuese superior al de los controles.

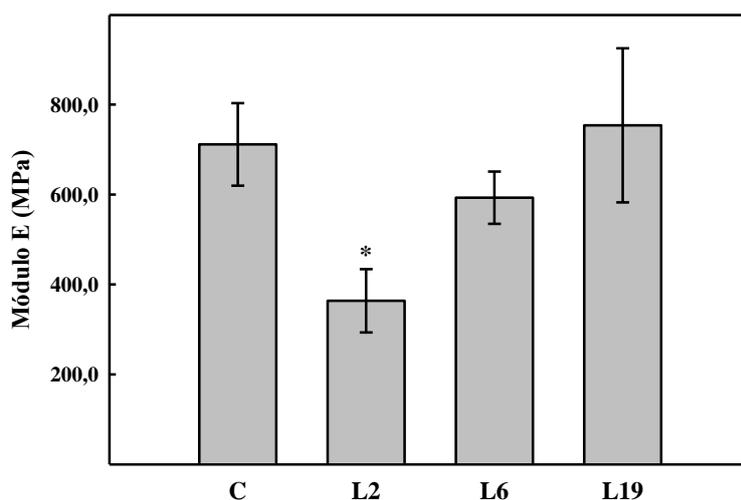


Figura C₃ 12.- En la figura se representan el valor medio y desviación estándar (barras de error) del módulo de Young, o módulo E, de los tallos de tabaco. Estos datos se obtuvieron del ensayo de 5 réplicas biológicas para cada línea y control. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto al control.

C: control L2: línea transgénica 2 L6: línea transgénica 6 L19: línea transgénica 19

El *ratio* G/S es una de las características más importantes de las ligninas, ya que está relacionado con el patrón de uniones entre las subunidades que conforman las ligninas y con la reactividad química de estos polímeros (Huang *et al.*, 2016). El hecho de que los diferentes monómeros posean diferentes capacidades de enlace hace que el *ratio* G/S no solo sea indicativo de los enlaces que establecerán entre ellos, sino también de los enlaces que establecerán con otras macromoléculas de la pared (Achyuthan *et al.*, 2010; Abreu *et al.*, 2009). Estas diferencias serán determinantes en las propiedades mecánicas de las maderas (Wang *et al.*, 2010; Bidlack *et al.*, 1992).

Una alta proporción de unidades S (*ratio* G/S bajo) favorece la presencia de uniones débiles β -O-4, conduciendo a moléculas de lignina con una alta simplicidad estructural. Estas ligninas poseen un bajo número de uniones entre monómeros, así como un bajo número de enlaces cruzados con los polisacáridos de la pared, y como resultado de la alta proporción de enlaces β -O-4 presentan una conformación más lineal y con una mayor expansión longitudinal (Abreu *et al.*, 2009; Achyuthan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). En contraposición, las ligninas con una alta proporción de unidades G poseen más ramificaciones y más enlaces cruzados, debido a la presencia de un gran número de enlaces C-C. También forman más enlaces cruzados con los polisacáridos de la pared. Además, una alta proporción de unidades guaiacilo favorece la aparición de estructuras condensadas. Todas estas características llevan a que las ligninas ricas en unidades guaiacilo posean una mayor rigidez molecular (Abreu *et al.*, 2009; Achyuthan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

De este modo, resulta bastante contradictorio que un mayor *ratio* G/S conduzca a un menor valor del módulo E. Sin embargo, esto podría tener su explicación en los trabajos de Ruel *et al.* (2001 y 2006). Estos autores señalan que para la cohesión de las paredes celulares secundarias es imprescindible el papel de las ligninas no condensadas, indicando que una brusca disminución de este tipo de ligninas, y presencia mayoritaria de ligninas condensadas, lleva a una pérdida de cohesión entre las microfibrillas de celulosas y a perturbaciones en su orientación. En el modelo que proponen (Figura C₃ 13), las ligninas que primero se depositarían en las paredes celulares secundarias serían las de tipo condensado. Estas ligninas se asociarían íntimamente a las hemicelulosas, revistiendo la superficie de las microfibrillas de celulosas. En un segundo momento se depositarían las ligninas de tipo no condensado, que interaccionarían con las ligninas de tipo condensado y actuarían como moléculas puente, promoviendo la cohesión de las paredes celulares secundarias. Las ligninas de tipo condensado no podrían desarrollar

esta función, debido al espacio restringido entre la red microfibrillar celulosas-hemicelulosas y las ligninas condensadas ya depositadas en el estadio temprano de la lignificación. Este espacio solo podría ser ocupado por un polímero con una conformación más extendida, como las ligninas no condensadas, y no en bloque, como las de tipo condensado.

En la formación de uniones condensadas o no condensadas influyen varios factores, uno de ellos es el ambiente en el que se produce la polimerización de los monolignoles, es decir, las características de la matriz constituida por los polímeros de la pared celular predepositados (Ruel *et al.*, 2001). Otro factor es la composición monomérica de las ligninas. Las ligninas de tipo guaiacilo, formadas por la polimerización de monómeros de alcohol coniferílico, están enriquecidas en unidades condensadas que implican uniones C-C, mientras que las ligninas de tipo siringilo dan lugar preferentemente a unidades no condensadas conectadas por enlaces β -O-4 (Leplé *et al.*, 2007).

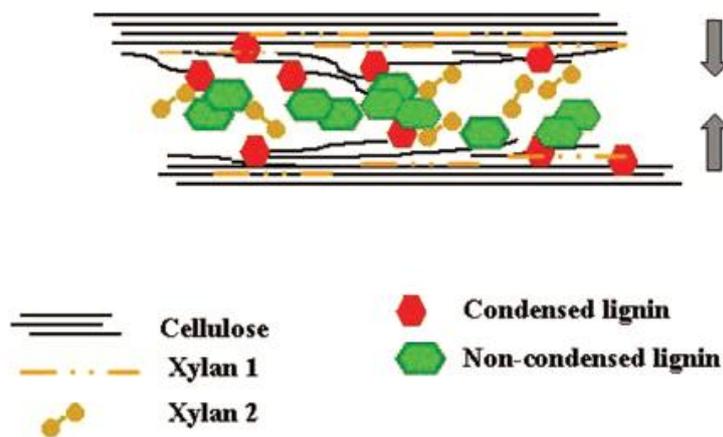


Figura C₃ 13.- Representación esquemática del modelo propuesto para el ensamblaje de los polímeros durante la formación de la pared celular secundaria. Imagen tomada de Ruel *et al.* (2006).

Quizá en el modelo propuesto por Ruel y sus colaboradores se encuentre la justificación de la menor rigidez de los tallos de la línea 2. El incremento de la relación G/S, junto con las alteraciones en lo que respecta a los carbohidratos de pared, a las que apuntaban los resultados del análisis mediante espectroscopía FTIR (apartado C₃ 4.4.), podrían haber favorecido un aumento en la proporción de ligninas condensadas, frente a las no condensadas, en las plantas de esta línea, promoviendo a su vez una disminución en la cohesión de las paredes celulares secundarias.

Existe constancia en la literatura de que una disminución en la cohesión de las paredes, debida a alteraciones de la matriz en que están embebidas las microfibrillas de celulosas, conlleva una disminución del valor del módulo E. **Li et al. (2011)** silenciaron la expresión de *PtrGT8D1* y *PtrGT8D2* (genes que codifican para glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis de xilano) en *Populus trichocarpa*. El contenido en xilano de estas plantas se redujo, mientras que el de celulosas no se vio alterado y el contenido en ligninas aumentó. El valor del módulo E del tallo de estas plantas se redujo, existiendo una correlación positiva entre el contenido en xilano y el valor del módulo E de las plantas transgénicas. Esto, según argumentaron los autores, fue debido al importante papel del xilano en el mantenimiento de la integridad de las paredes celulares secundarias, de tal modo que la reducción del contenido en este polímero debilitó la cohesión que confiere la matriz hemicelulosas-ligninas entre las microfibrillas de celulosas.

Los resultados de **Koehler y Telewski (2006)** también apoyan el modelo propuesto por Ruel y sus colaboradores y, así pues, la hipótesis de que en él se encuentre la justificación de la menor rigidez de los tallos de la línea 2. Sus estudios en líneas transgénicas de chopo (*Populus tremula* X *Populus alba*) que sobreexpresaban el gen de la enzima F5H (ferulato 5-hidroxilasa) mostraron que estas plantas poseían un mayor contenido en unidades S, y por tanto un menor *ratio* G/S, y que esto llevaba a que el valor de su módulo E aumentase. Koehler y Telewski señalan que este aumento del valor del módulo E con la disminución del *ratio* G/S es debido a que las ligninas ricas en unidades S son más lineales, lo que favorece un empaquetado más estrecho de estos polímeros en las paredes celulares, llevando a una mayor rigidez de estas estructuras.

C₃ 4.6. Caracterización de los transformantes a través del análisis de posibles modificaciones de su crecimiento/desarrollo

En numerosas ocasiones se han descrito alteraciones en el crecimiento y/o desarrollo de mutantes y líneas transgénicas con modificaciones en genes que participan en la biosíntesis de las ligninas (**Pinçon et al., 2001; Anterola y Lewis, 2002; Patten et al., 2005**). Por este motivo se registró periódicamente la longitud del tallo de plantas de las tres líneas transgénicas hasta el cese de su crecimiento, con el objetivo de establecer una curva de crecimiento para cada línea (**Figura C₃ 14**) y observar posibles diferencias respecto de las plantas control no transgénicas.

Tal y como se observa en la **Figura C₃ 14**, las curvas de crecimiento de las líneas transgénicas 6 y 19 son prácticamente idénticas a la del control, sin embargo la línea 2 posee una curva de crecimiento que difiere ligeramente de la del resto de plantas (transgénicas y controles). Como se aprecia en el gráfico de la **Figura C₃ 14**, las plantas de la línea 2 parecen incrementar su altura más rápido que las plantas control y que las de las líneas 6 y 19, siendo también más precoces en cuanto al momento de la floración.

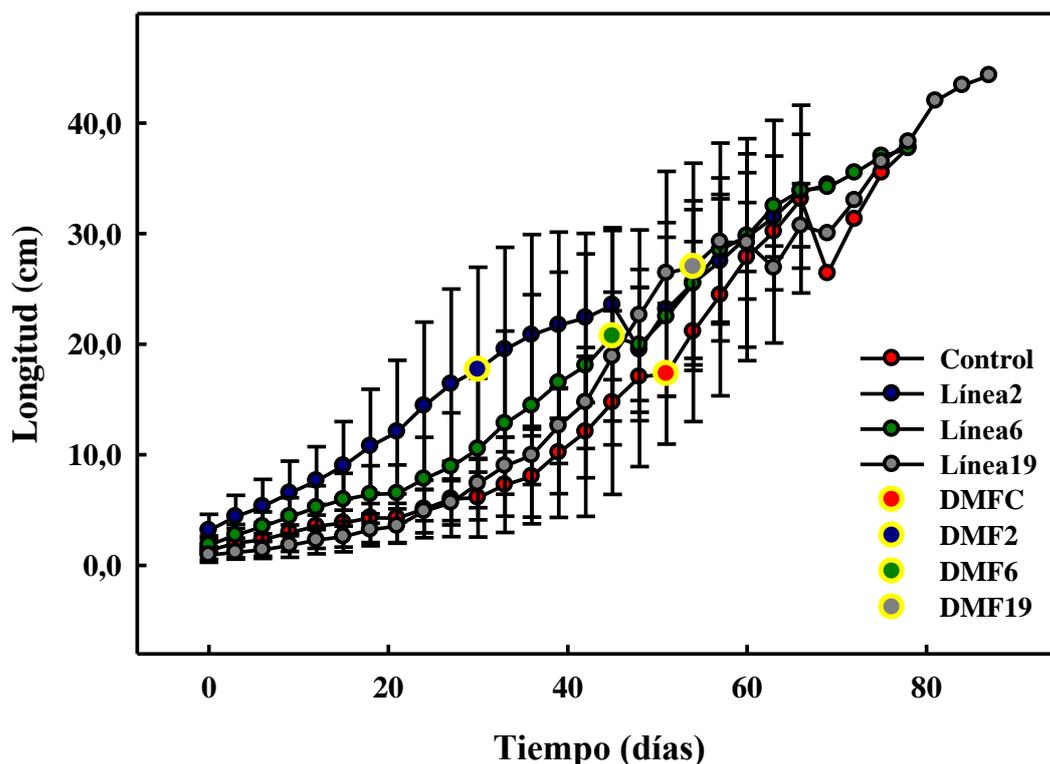


Figura C₃ 14.- Curvas de crecimiento de las líneas transgénicas (líneas 2, 6 y 19) y de las plantas control. Cada curva se construyó a partir de la media de los valores registrados para 5 plantas. Las barras de error representan la desviación estándar. Sobre cada curva se indica también el día medio de floración (DMF) de cada una de las líneas y del control.
DMFC: día medio de floración del control DMF2: día medio de floración de la línea 2 DMF6: día medio de floración de la línea 6 DMF19: día medio de floración de la línea 19

Dadas las múltiples e importantes funciones de las paredes celulares en la fisiología de las plantas, alteraciones en estas estructuras pueden conllevar cambios fenotípicos en los vegetales, pérdida de la funcionalidad de determinados tipos celulares, alteraciones en la susceptibilidad a patógenos e incluso comprometer la viabilidad del vegetal (**Loqué et al., 2015; Martínez et al., 2009; Franke et al., 2002; Jones et al., 2001**). De esto se deduce que las alteraciones de las paredes celulares pueden llevar a las plantas afectadas a una situación de estrés, y una de las formas de respuesta de las plantas de tabaco ante

situaciones de estrés es acortar su ciclo vegetativo y desarrollar una floración temprana (Fisher y Gultinan, 1995). Esto podría ser lo que ocurre en el caso de las plantas de la línea 2, que las alteraciones en los polímeros de sus paredes celulares y en sus propiedades mecánicas estén llevando a estas plantas a una situación de estrés, a la que responden con un desarrollo más rápido y una floración más precoz. Tal y como se había comentado en el apartado anterior, Koehler y Telewski (2006) observaron que plantas transgénicas de chopo que sobreexpresaban el gen de la enzima F5H poseían un mayor contenido en unidades S, y así pues un menor *ratio* G/S, y que esto llevaba a que el valor de su módulo E aumentase. Sin embargo, a pesar de ese incremento en el valor del módulo E, la rigidez a la flexión de estas plantas no se veía modificada. Esto era debido a que el incremento del valor del módulo E aparecía compensado por una reducción del diámetro del tallo.

Tabla C₃ 4. Diámetro de las plantas de tabaco en el momento del cese de su crecimiento.

	Control	Línea 2	Línea 6	Línea 19
Diámetro (mm)	5,342 ± 0,536	4,934 ± 0,378	6,506 ± 0,338	6,316 ± 0,774

Los resultados corresponden a la media ± la desviación estándar obtenidas de la medida del diámetro de 5 plantas.

En el caso de las plantas de la línea 2, además de mostrar un valor del módulo E significativamente inferior al de las plantas control, también poseen tallos con un diámetro ligeramente inferior al de estas últimas (Tabla C₃ 4). Quizá esto lleve a una notable reducción en la rigidez a la flexión de estas plantas, lo que provoca en ellas una situación de estrés a la que responden con un desarrollo más rápido y una floración más precoz.

C₃ 5. Resumen

Los resultados obtenidos a lo largo de este capítulo parecen indicar que VviPrx73 está implicada en el proceso de lignificación, sin embargo, la presencia de esta proteína en plantas de tabaco transgénicas no provoca ningún cambio fenotípico claro que pueda ser de interés.

El incremento, estadísticamente significativo, en la actividad peroxidasa frente a sustratos de la lignificación en el apoplasto de las plantas transgénicas (Capítulo 2 apartado C₂ 4.5.) se tradujo simplemente en un ligero aumento en el contenido en ligninas, que no llega a ser significativamente diferente al del control. Probablemente el estar modificando únicamente el último paso, de polimerización, en la síntesis de las ligninas, no permita grandes variaciones en el contenido en este polímero debido a la falta de sustratos (monolignoles) disponibles. La síntesis de ligninas es un proceso muy costoso para las plantas y en condiciones normales un aumento en el contenido en este polímero no supone ningún beneficio para los vegetales. De este modo, no resulta extraño que, a pesar del aumento en la actividad peroxidasa en su apoplasto, no alteren pasos anteriores de la ruta para incrementar la disponibilidad de monolignoles y la cantidad global de ligninas.

En cuanto a la composición de las ligninas en los transformantes, solo se observaron diferencias respecto a los controles en la línea 2, que posee una mayor relación G/S. El comportamiento de las líneas 6 y 19 era esperable dado que, como se vio en el apartado C₂ 4.5. del Capítulo 2, el *ratio* actividad coniferil-peroxidasa/actividad sinapil-peroxidasa en el apoplasto de las líneas transgénicas es prácticamente el mismo que en los controles. En cuanto a la línea 2, su comportamiento diferente no parece estar asociado a la presencia de VviPrx73, sino que se cree que podría ser debido a algún tipo de alteración en el parental de la línea, derivada del proceso de transformación y/o regeneración.

Los resultados del análisis de las paredes celulares mediante espectroscopía FTIR parecen corroborar el ligero incremento en el contenido en ligninas en las líneas transgénicas, además señalan a un mayor contenido en carbohidratos de pared en estas últimas. También apuntan a diferencias entre las tres líneas transgénicas en lo que respecta a sus carbohidratos de pared. Esto vendría reflejado por las discrepancias entre los espectros de estas líneas en la región de 950 cm⁻¹-1200 cm⁻¹, que son especialmente patentes entre el espectro de la línea 2 y el de las otras dos líneas transgénicas, y podrían

ser debidas bien a diferencias en el contenido en carbohidratos o bien a diferencias en la composición en carbohidratos o en las características de estos polímeros.

Las diferencias en los polisacáridos de pared, respecto a los controles, sumadas a un mayor *ratio* G/S, podrían haber llevado a una mayor proporción de ligninas condensadas en las plantas de la línea 2, que según el modelo de deposición de los componentes de las paredes celulares secundarias propuesto por **Ruel et al. (2001 y 2006)** provocaría una pérdida de cohesión de las paredes y perturbaciones en la orientación de las microfibrillas de celulosas. Alteraciones que podrían ser la respuesta a las discrepancias en los espectros de absorción en la región 950 cm⁻¹-1200 cm⁻¹ que, tal y como se comentó, eran especialmente notables entre la línea 2 y las demás líneas transgénicas. Esto se vería apoyado por el hecho de que el origen de la mayoría de bandas que aparecen en esta región se encuentra en las hemicelulosas y celulosas, polímeros que, atendiendo al modelo propuesto por Ruel y sus colaboradores, serían los más afectados por la pérdida de cohesión derivada de un bajo contenido en ligninas no condensadas.

Por otra parte, la pérdida de cohesión de las paredes y perturbaciones en la orientación de las microfibrillas de celulosas podrían ser las responsables de que las plantas de la línea 2 presenten un valor del módulo E inferior al de los controles.

Como cabría esperar, solo las plantas de la línea 2 mostraron diferencias en su crecimiento y desarrollo respecto de las plantas control, manifestando un crecimiento más rápido y floración más precoz. Se cree que estas alteraciones puedan constituir su respuesta a una situación de estrés provocada por la alteración de sus propiedades mecánicas.

Todos los datos en conjunto apuntan a que si bien VviPrx73 sí parece estar implicada en lignificación, su presencia en los tabacos transgénicos no provoca ninguna alteración fenotípica significativa, más allá de un aumento en la actividad peroxidasa frente a sustratos de la lignificación en el apoplasto. Probablemente esto sea debido a que las peroxidasas participan en el último paso de la síntesis de ligninas, por lo que puede estar dándose una limitación por falta de sustrato (monolignoles). Las plantas transgénicas lejos de poner en marcha cambios que lleven a aumentar la disponibilidad de monolignoles, parece que responden a la inserción de la secuencia que codifica para VviPrx73 reprogramando la expresión de genes de peroxidasas endógenas con el objetivo de mantener inalterado su *ratio* actividad coniferil-peroxidasa/actividad sinapil-

peroxidasa, y así pues contrarrestar los posibles efectos derivados de la presencia de VviPrx73.

En el caso de la línea 2 sí se observaron diferencias respecto al control, sin embargo, los datos obtenidos parecen apuntar a que el origen de estas diferencias esté en algún tipo de alteración que sufrió el parental de la línea, bien durante el proceso de regeneración o debida al lugar de inserción del ADN-T, y no relacionado con la presencia de VviPrx73.

C₃ 6. Bibliografía

Abreu HS, Latorraca JV, Pereira RP, Monteiro MB, Abreu FA y Amparado KF. 2009. A supramolecular proposal of lignin structure and its relation with the wood properties. *An Acad Bras Cienc* 81: 137-142.

Achyuthan KE, Achyuthan AM, Adams PD, Dirk SM, Harper JC, Simmons BA y Singh AK. 2010. Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. *Molecules* 15: 8641-8688.

Alonso-Simón A, García-Angulo P, Mérida H, Encina A, Álvarez JM y Acebes JL. 2011. The use of FTIR spectroscopy to monitor modifications in plant cell wall architecture caused by cellulose biosynthesis inhibitors. *Plant Signal Behav* 6: 1104-1110.

Amthor JS. 2003. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Ann Bot* 91: 673-695.

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

Barros J, Serk H, Granlund I y Pesquet E. 2015. The cell biology of lignification in higher plants. *Ann Bot* 115: 1053-1074.

Baucher M, Monties B, Van Montagu M y Boerjan W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *CRC Crit Rev Plant Sci* 17: 125-197.

Bidlack J, Malone M y Benson R. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc Okla Acad Sci* 72: 51-56.

Boerjan W, Ralph J y Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519-546.

Bonawitz ND y Chapple C. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu Rev Genet* 44: 337-363.

Boudet AM, Lapierre C y Grima-Pettenati J. 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol* 129: 203-236.

Bui NQ, Fongarland P, Rataboul F, Dartiguelongue C, Charon N, Vallée C y Essayem N. 2015. FTIR as a simple tool to quantify unconverted lignin from chars in biomass liquefaction process: application to SC ethanol liquefaction of pine wood. *Fuel Process Technol* 134: 378-386.

Chabannes M, Ruel K, Yoshinaga A, Chabbert B, Jauneau A, Joseleau JP y Boudet AM. 2001. *In situ* analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J* 28: 271-282.

Chiang VL, Puumala RJ, Takeuchi H y Eckert RE. 1988. Comparison of softwood and hardwood kraft pulping. *Tappi J* 71: 173-176.

Cintrón MS y Hinchliffe DJ. 2015. FT-IR examination of the development of secondary cell wall in cotton fibers. *Fibers (Basel)* 3: 30-40.

Daras G, Rigas S, Penning B, Milioni D, McCann MC, Carpita NC, Fasseas C y Hatzopoulos P. 2009. The *thanatos* mutation in *Arabidopsis thaliana* cellulose synthase 3 (*AtCesA3*) has a dominant-negative effect on cellulose synthesis and plant growth. *New Phytol* 184: 114-126.

Dorado J, Almendros G, Field JA y Sierra-Álvarez R. 2001. Infrared spectroscopy analysis of hemp (*Cannabis sativa*) after selective delignification by *Bjerkandera* sp. at different nitrogen levels. *Enzyme Microb Technol* 28: 550-559.

Espiñeira JM, Novo Uzal E, Gómez Ros LV, Carrión JS, Merino F, Ros Barceló A y Pomar F. 2011. Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants. *Plant Biol (Stuttg)* 13: 59-68.

Fagard M, Desnos T, Desprez T, Goubet F, Refregier G, Mouille G, McCann M, Rayon C, Vernhettes S y Höfte H. 2000. *PROCUSTE1* encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 2409-2423.

Feraru E, Feraru MI, Kleine-Vehn J, Martinière A, Mouille G, Vanneste S, Vernhettes S, Runions J y Friml J. 2011. PIN polarity maintenance by the cell wall in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 21: 338-343.

Fisher DK y Gultinan MJ. 1995. Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol. *Plant Mol Biol Report* 13: 278-289.

Franke R, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Humphreys JM y Chapple C. 2002. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *Plant J* 30: 47-59.

Gómez Ros LV, Gabaldón C, Pomar F, Merino F, Pedreño MA y Barceló AR. 2007. Structural motifs of syringyl peroxidases predate not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. *New Phytol* 173: 63-78.

He L y Terashima N. 1991. Formation and structure of lignin in monocotyledons. IV. Deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugarcane and rice plant studied by ultraviolet microscopic spectroscopy. *Holzforschung* 45: 191-198.

Higuchi T. 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol* 24: 23-63.

Huang Y, Wang L, Chao Y, Nawawi DS, Akiyama T, Yokoyama T y Matsumoto Y. 2016. Relationships between hemicellulose composition and lignin structure in woods. *J Wood Chem Technol* 36: 9-15.

Iiyama K y Wallis AFA. 1988. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci Technol* 22: 271-280.

Jones L, Ennos AR y Turner SR. 2001. Cloning and characterization of *irregular xylem4 (irx4)*: a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant J* 26: 205-216.

Kačuráková M, Capek P, Sasinková V, Wellner N y Ebringerová A. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr Polym* 43: 195-203.

Koehler L y Telewski FW. 2006. Biomechanics and transgenic wood. *Am J Bot* 93: 1433-1438.

Lai YZ. 1991. Chemical degradation. En: Hon DNS y Shiraishi N (eds.). *Wood and Cellulose Chemistry*. Marcel Dekker. New York, USA. pp. 455-523.

Lai YZ y Sarkanen KV. 1975. Structural variation in dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol. *Cellulose Chem Tech* 9: 239-245.

Lapierre C, Pollet B y Rolando C. 1995. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res Chem Intermed* 21: 397-412.

Lepié JC, Dauwe R, Morreel K, Storme V, Lapierre C, Pollet B, Naumann A, Kang KY, Kim H, Ruel K, Lefèbvre A, Joseleau JP, Grima-Pettenati J, De Rycke R, Andersson-Gunnerås S, Erban A, Fehrle I, Petit-Conil M, Kopka J, Polle A, Messens E, Sundberg B, Mansfield SD, Ralph J, Pilate G y Boerjan W. 2007. Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. *Plant Cell* 19: 3669-3691.

Lewis NG y Yamamoto E. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496.

Li Q, Min D, Wang JP, Peszlen I, Horvath L, Horvath B, Nishimura Y, Jameel H, Chang HM y Chiang VL. 2011. Down-regulation of glycosyltransferase 8D genes in *Populus trichocarpa* caused reduced mechanical strength and xylan content in wood. *Tree Physiol* 31: 226-236.

Lin CY, Li Q, Tunlaya-Anukit S, Shi R, Sun YH, Wang JP, Liu J, Loziuk P, Edmunds CW, Miller ZD, Peszlen I, Muddiman DC, Sederoff RR y Chiang VL. 2016. A cell wall-bound anionic peroxidase, PtrPO21, is involved in lignin polymerization in *Populus trichocarpa*. *Tree Genet Genomes* 12: 22.

- Liu Y, Thibodeaux D y Gamble G.** 2011. Development of Fourier transform infrared spectroscopy in direct, non-destructive, and rapid determination of cotton fiber maturity. *Text Res J* 81: 1559-1567.
- Loqué D, Scheller HV y Pauly M.** 2015. Engineering of plant cell walls for enhanced biofuel production. *Curr Opin Plant Biol* 25: 151-161.
- Maréchal Y y Chanzy H.** 2000. The hydrogen bond network in I_β cellulose as observed by infrared spectrometry. *J Mol Struct* 523: 183-196.
- Marjamaa K, Kukkola E, Lundell T, Karhunen P, Saranpää P y Fagerstedt KV.** 2006. Monolignol oxidation by xylem peroxidase isoforms of Norway spruce (*Picea abies*) and silver birch (*Betula pendula*). *Tree Physiol* 26: 605-611.
- Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Del Río JC y Gutiérrez A.** 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr Opin Biotechnol* 20: 348-357.
- Martone PT, Estevez JM, Lu F, Ruel K, Denny MW, Somerville C y Ralph J.** 2009. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Curr Biol* 19: 169-175.
- McCann MC, Defernez M, Urbanowicz BR, Tewari JC, Langewisch T, Olek A, Wells B, Wilson RH y Carpita NC.** 2007. Neural network analyses of infrared spectra for classifying cell wall architectures. *Plant Physiol* 143: 1314-1326.
- Monties B.** 1985. Recent advances on lignin inhomogeneity. En: Van Sumere CF y Lea PJ (eds.). *The biochemistry of plant phenolics* (Annual proceedings of the Phytochemical Society of Europe, vol. 25). Oxford University Press. Oxford, Inglaterra. pp. 161-181.
- Monties B.** 1989. Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation to possible self-organization of lignin networks. *Ann Sci For* 46 Suppl.: 848s-855s.
- Monties B.** 1991. Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites: relations with lignin structure and function. *Anim Feed Sci Technol* 32: 159-175.
- Monties B y Lapierre C.** 1981. Données récentes sur l'hétérogénéité de la lignine. *Physiol Veg* 19: 327-348.
- Pandey KK.** 1999. A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *J Appl Polym Sci* 71: 1969-1975.
- Patten AM, Cardenas CL, Cochrane FC, Laskar DD, Bedgar DL, Davin LB y Lewis NG.** 2005. Reassessment of effects on lignification and vascular development in the *irx4 Arabidopsis* mutant. *Phytochemistry* 66: 2092-2107.
- Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, Surman C, Newman LJ, Smith C, Bevan MW, Mansfield S, Whetten RW, Sederoff RR y Campbell MM.** 2003. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J* 36: 743-754.

Pinçon G, Maury S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B y Legrand M. 2001. Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* 57: 1167-1176.

Poletto M, Zattera AJ y Santana RMC. 2012. Structural differences between wood species: evidence from chemical composition, FTIR spectroscopy, and thermogravimetric analysis. *J Appl Polym Sci* 126: 336-343.

Pomar F, Caballero N, Pedreño M y Ros Barceló A. 2002a. H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS Lett* 529: 198-202.

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

Popescu CM, Singurel G, Popescu MC, Vasile C, Argyropoulos DS y Willför S. 2009. Vibrational spectroscopy and X-ray diffraction methods to establish the differences between hardwood and softwood. *Carbohydr Polym* 77: 851-857.

Pozo C, Díaz-Visurraga J, Contreras D, Freer J y Rodríguez J. 2016. Characterization of temporal biodegradation of radiata pine by *Gloeophyllum trabeum* through principal component analysis-based two-dimensional correlation FTIR spectroscopy. *J Chil Chem Soc* 61: 2878-2883.

Ralph J, Kim H, Lu F, Grabber JH, Leplé JC, Berrio-Sierra J, Derikvand MM, Jouanin L, Boerjan W y Lapierre C. 2008. Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperm lignins (and an indicator for cinnamoyl-CoA reductase deficiency). *Plant J* 53: 368-379.

Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH y Boerjan W. 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl propanoids. *Phytochem Rev* 3: 29-60.

Rischer H y Oksman-Caldentey KM. 2006. Unintended effects in genetically modified crops: revealed by metabolomics? *Trends Biotechnol* 24: 102-104.

Rogers LA y Campbell MM. 2004. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. *New Phytol* 164: 17-30.

Ros Barceló A. 1997. Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* 176: 87-132.

Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS y Pedreño MA. 2004. Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution? *Phytochem Rev* 3: 61-78.

Ros Barceló A, Pomar F y Pedreño MA. 2000. Competitive inhibitor-dissected histochemistry of the peroxidase responsible for syringyl lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* xylem. *Aust J Plant Physiol* 27: 1101-1107.

Ruel K, Chabannes M, Boudet A, Legrand M y Joseleau J. 2001. Reassessment of qualitative changes in lignification of transgenic tobacco plants and their impact on cell wall assembly. *Phytochemistry* 57: 875-882.

Ruel K, Chevalier-Billosta V, Guillemin F, Berrio-Sierra J y Joseleau JP. 2006. The wood cell wall at the ultrastructural scale-formation and topochemical organization. *Maderas Cienc Tecnol* 8: 107-116.

Ruel K, Montiel MD, Goujon T, Jouanin L, Burlat V y Joseleau JP. 2002. Interrelation between lignin deposition and polysaccharide matrices during the assembly of plant cell walls. *Plant Biol (Stuttg)* 4: 2-8.

Schindelman G, Morikami A, Jung J, Baskin TI, Carpita NC, Derbyshire P, McCann MC y Benfey PN. 2001. COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 15: 1115-1127.

Schnell J, Steele M, Bean J, Neuspiel M, Girard C, Dormann N, Pearson C, Savoie A, Bourbonnière L y Macdonald P. 2015. A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments. *Transgenic Res* 24: 1-17.

Terashima N y Fukushima K. 1988. Heterogeneity in formation of lignin. XI. An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Sci Technol* 22: 259-270.

Terashima N y Fukushima K. 1989. Biogenesis and structure of macromolecular lignin in the cell wall of tree xylem as studied by microautoradiography. En: Lewis NG y Paice MG (eds.). *Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation*. ACS Symp Series, vol. 399. Am Chem Soc. Washington DC, USA. pp. 160-168.

Trabucco GM, Matos DA, Lee SJ, Saathoff AJ, Priest HD, Mockler TC, Sarath G y Hazen SP. 2013. Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid *O*-methyltransferase in *Brachypodium distachyon*. *BMC Biotechnol* 13: 61.

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J y Boerjan W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* 153: 895-905.

Wang Y, Chantreau M, Sibout R y Hawkins S. 2013. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Front Plant Sci* 4: 220.

Wang Y, Gril J, Clair B, Minato K y Sugiyama J. 2010. Wood properties and chemical composition of the eccentric growth branch of *Viburnum odoratissimum* var. *awabuki*. *Trees (Berl West)* 24: 541-549.

Wardrop AB. 1976. Lignification of plant cell wall. En: Timell TE (ed.). *Proceedings of the 8th Cellulose Conference (Applied Polymer Symposia, vol. 28)*. Wiley-Interscience. New York, USA. pp. 1041-1063.

Whetten R y Sederoff R. 1995. Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-1013.

Wu J, Fukazawa K y Ohtani J. 1992. Distribution of syringyl and guaiacyl lignins in hardwoods in relation to habitat and porosity form in wood. *Holzforschung* 46: 181-185.

Yue F, Lu F, Sun RC, Ralph J. 2012. Syntheses of lignin-derived thioacidolysis monomers and their uses as quantitation standards. *J Agric Food Chem* 60: 922-928.

Zenoni S, Reale L, Tornielli GB, Lanfaloni L, Porceddu A, Ferrarini A, Moretti C, Zamboni A, Speghini A, Ferranti F y Pezzotti M. 2004. Downregulation of the *Petunia hybrida* α -expansin gene *PhEXP1* reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs. *Plant Cell* 16: 295-308.

Zhou G, Taylor G y 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.

Zolla L, Rinalducci S, Antonioli P y Righetti PG. 2008. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. *J Proteome Res* 7: 1850-1861.

C~Conclusiones

1. The grapevine actin 7 gene promoter and terminator (PV*viACT7* and TV*viACT7*, respectively) drive the high level constitutive expression of transgenes in tobacco plants. Furthermore, they lead to very stable expression levels between the different transgenic lines.
2. The grapevine gene annotated as peroxidase 73 gene (VIT_07s0129g00360) encodes a class III peroxidase, peroxidase 73 (VviPrx73).
3. VviPrx73 is apparently an apoplastic peroxidase involved in cell wall lignification, being able to oxidize both coniferyl alcohol and sinapyl alcohol, but showing a clear preference for the former.
4. The introduction of the sequence encoding for VviPrx73 in tobacco plants causes the alteration of the basic peroxidase isoforms pattern of these plants. In addition, it leads to an increase in its apoplastic peroxidase activity against coniferyl alcohol and sinapyl alcohol. Despite the preference of VviPrx73 for coniferyl alcohol, coniferyl-peroxidase activity/sinapyl-peroxidase activity ratio in transgenic plants remains constant, probably due to modulation of the expression of other peroxidase genes.
5. The presence of VviPrx73 leads to a slight increase in lignins content of transgenic tobacco plants, however, this is not significantly different from control plants. FTIR spectra of tobacco cell walls also revealed a slightly higher carbohydrate content in transformants compared to controls. No differences were found in lignins spatial repartition between transgenic and non-transgenic tobacco plants.
6. Of the three transgenic lines expressing the *VviPrx73* coding region analyzed, one revealed significant differences, compared to controls, in terms of monomeric composition of lignins, mechanical properties of their stems, growth, and development. This line has lignins with higher G/S ratio, lower stem stiffness (as indicated by its lower module E value), faster growth and faster development. None of these changes are considered to be directly associated with the presence of VviPrx73.
7. The expression of *VviPrx73* coding region in tobacco plants did not cause any clear phenotype in the studied characteristics of the transformants of potential interest in

C-Conclusiones

terms of pathogen resistance. Therefore, in view of these results, overexpression of *VviPrx73* coding region does not seem to be a good strategy for the generation of pathogen resistant grapevines. However, it is not ruled out that the analysis of other characteristics of these transgenic tobacco plants, or the evaluation of this strategy in another species could be relevant.

A~Anexos

A 1. Transformación de células de *Escherichia coli*

A 1.1. Preparación de células competentes de *E. coli* cepa DH5 α

La preparación de células competentes de *E. coli* se inició inoculando 10 ml de medio LB (Luria-Bertani) (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l cloruro de sodio) con 20 μ l de cultivo de *E. coli* cepa DH5 α , esto se incubó a 37 °C y en agitación durante toda la noche. A continuación, se realizó una dilución de la suspensión bacteriana en una proporción 1:200 (v/v) en 200 ml de medio LB, y se prosiguió cultivando las bacterias hasta alcanzar una OD₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm) entre 0,45 y 0,55. En ese momento, se enfrió el cultivo manteniéndolo en hielo durante 15 minutos, seguidamente se centrifugó a 4 °C y 4000g durante 7 minutos. Se retiró el sobrenadante, y el precipitado de bacterias se resuspendió en 40 ml de MgCl₂ 0,1M (previamente enfriado). La suspensión se incubó en hielo durante 15-20 minutos y a continuación se centrifugó a 4 °C y 4000g durante 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en 4 ml de CaCl₂ 0,1M (previamente enfriado). La suspensión se mantuvo en hielo durante 1 hora, pasado ese tiempo se le añadieron 710 μ l de glicerol 100 % estéril. Se agitó hasta conseguir una mezcla homogénea y se dispensó en viales, cada uno de los cuales contenía 100 μ l de suspensión bacteriana. Estas alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido para ser conservadas a -80 °C hasta su uso.

A 1.2. Transformación de *E. coli* mediante choque térmico

El primer paso en la transformación de las bacterias consistió en añadir la mitad del volumen de la ligación a una alícuota de 100 μ l de células de *E. coli* DH5 α competentes. Las bacterias se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y pasado ese tiempo se incubaron en un bloque térmico a 42 °C durante 1 minuto y 40 segundos. Los viales con bacterias se transfirieron nuevamente a hielo, donde se mantuvieron durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 600 μ l de medio LB a cada vial y se incubaron a 37 °C y en agitación durante 1 hora y media. Tras la incubación, se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 minutos en una centrífuga de mesa. Se retiraron 400 μ l del sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en el volumen restante.

Seguidamente, se sembraron 10 µl de la suspensión bacteriana en medio LB sólido (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l cloruro de sodio, 15 g/l agar) con el antibiótico correspondiente (en el caso de bacterias transformadas con plásmido pGreenII0179, o derivados de este, se empleó kanamicina 50 mg/l, en el caso de bacterias transformadas con el pJit62, o plásmidos derivados de este, se usó carbenicilina 100 mg/l). Por último, las bacterias se incubaron hasta el día siguiente a 37 °C.

A 1.3. Selección de las bacterias que incorporaron el plásmido de interés

La verificación de que las bacterias que crecieron en el medio de selección con antibiótico habían incorporado el plásmido de interés se llevó a cabo mediante PCR.

Esta PCR se realizó usando como enzima la DreamTaq™ ADN Polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y cebadores que amplifican una región del plásmido de interés. En la **Tabla A 1** se detallan los datos de todas las PCR realizadas durante este trabajo para testar que las bacterias habían incorporado el plásmido de interés.

Tabla A 1. Condiciones bajo las que se realizaron las PCR para confirmar que las bacterias transformadas portaban el plásmido de interés.

Mezcla de PCR		Programa de PCR			
Tampón 10X DreamTaq	2,5 µl	Desnaturalización inicial	95	5-10 min	1
Mezcla de desoxirribonucleótidos	0,2 mM (cf de cada uno)	Desnaturalización	95	30 s	
Cebador <i>forward</i> *	0,4 µM cf	Annealing	Tm-5	30 s	35
Cebador <i>reverse</i> *	0,4 µM cf	Extensión	72	**	
ADN molde	x	Extensión final	72	10 min	1
DreamTaq ADN Polimerasa	1,25 U				
Agua MilliQ	Hasta 25 µl				
Volumen total	25 µl				

cf: concentración final Tm: temperatura de *melting* de los cebadores

* Para el *screening* de bacterias transformadas con plásmidos que contienen el gen *uidA*, los cebadores empleados fueron los utilizados en la clonación de dicho gen (apartado C₁ 3.2.1 del Capítulo 1). En el caso de las bacterias que fueron transformadas con plásmidos que contienen la región codificante de *VviPrx73* (incluidos aquellos en que está fusionada a *mgfp4*) los cebadores empleados fueron los mismos que para la clonación de la región codificante de *VviPrx73* (apartado C₂ 3.2.1 del Capítulo 2)

** El tiempo de extensión fue diferente dependiendo de la secuencia que se intentaba amplificar en cada *screening*. En los casos en que se buscaba amplificar la secuencia del gen *uidA*, el tiempo de extensión fue de 2 min y 30 s, para la amplificación de la región codificante de *VviPrx73* el tiempo seleccionado era de 1 min y 30 s, en el caso en que se deseaba amplificar la fusión de esta última secuencia con la de *mgfp4*, el tiempo de extensión fue de 2 min y 30 s

La particularidad de esta PCR reside en que no se realiza una extracción previa del ADN plasmídico de las bacterias, sino que se añaden directamente las propias bacterias

a la mezcla de PCR, depositando en cada vial una pequeña cantidad de cada una de las colonias a testar. Además, en el programa de PCR se incrementa la duración de la desnaturalización inicial a 5-10 minutos, para favorecer la lisis de las bacterias.

A 2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de *A. tumefaciens* se realizó por electroporación, para ello se añadieron 150 ng de cada plásmido a 100 µl de *Agrobacterium* electrocompetentes, manteniéndolas a una temperatura de 4 °C. Esta mezcla se depositó en una cubeta (previamente enfriada) del electroporador. La transformación de *Agrobacterium* se llevó a cabo mediante el sistema MicroPulser™ Electroporator (BIO RAD), empleando el programa propuesto por el fabricante para la transformación de estas bacterias (5 ms, 2,2 kV).

Inmediatamente tras el pulso, se retiró la cubeta y se añadió 1 ml de medio YEB (*yeast extract broth*) (5 g/l triptona, 1 g/l extracto de levadura, 5 g/l caldo de nutrientes, 5 g/l sacarosa, 0,49 g/l MgSO₄·7H₂O) (pH=7,2). A continuación, las bacterias se transfirieron a un vial y se incubaron en agitación continua durante 2 horas a 28 °C.

Pasado ese tiempo, se sembraron tres volúmenes de bacterias (20 µl, 50 µl y 150 µl) en placas de medio YEB sólido (5 g/l triptona, 1 g/l extracto de levadura, 5 g/l caldo de nutrientes, 5 g/l sacarosa, 0,49 g/l MgSO₄·7H₂O, 15 g/l agar) (pH=7,2) con los antibióticos correspondientes (25 mg/l rifampicina, 50 mg/l kanamicina y 7,5 mg/l tetraciclina), y se cultivaron durante 2 días a 28 °C.

Por último, se testó mediante PCR si las bacterias que habían crecido en medio selectivo incorporaran los plásmidos. Esto se llevó a cabo tal y como se describe para *E. coli* en el apartado A 1.3.

En el caso de las *Agrobacterium* transformadas con el pGreenII0179, para la detección de las bacterias que incorporaron este plásmido los cebadores empleados fueron 5'-GGTAACGCCAGGGTTTTCCAGT-3' y 5'-CCCGGGCTGCAGGAATTCGAT-3', y el tiempo de extensión durante la PCR fue de 1 min.

A 3. Obtención de líneas de tabaco transgénicas homocigotas

Las plantas transgénicas regeneradas de los experimentos de transformación, y en las que se probó mediante PCR que habían incorporado el transgén (plantas parentales, T₀) constituyeron el punto de partida para la obtención de las líneas transgénicas homocigotas.

Estas plantas transgénicas parentales fueron cultivadas en tierra, bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C, hasta el momento en que produjeron semillas por autopolinización. A continuación, se recogieron las semillas, que constituyeron la T₁, y una parte de ellas fue empleada para realizar un análisis de segregación, que permitió conocer qué parentales poseían una única copia del gen de interés. Dicho análisis consistió en la siembra de al menos 30 semillas provenientes de cada parental en medio de cultivo con antibiótico, en concreto higromicina, ya que el plásmido pGreenII0179 posee el gen de resistencia a higromicina *AphIV*.

Se considera que un parental porta una única copia del gen de resistencia a antibiótico, que es la situación deseada, si el análisis de segregación realizado con su descendencia (semillas T₁) indica que la proporción entre descendientes no resistentes al antibiótico y descendientes resistentes coincide con la proporción esperable para la descendencia resultado del autocruce de un individuo heterocigoto y tratándose de un carácter dominante con herencia mendeliana, es decir, se da una proporción de 1:3 (no resistentes a antibiótico:resistentes a antibiótico) (Fisher y Gultinan, 1995; Tizaoui y Kchouk, 2012; Karchi *et al.*, 1994). En los plásmidos empleados para transformación mediante *Agrobacterium*, tanto el gen de resistencia a antibiótico como el gen de interés se encuentran en el ADN-T (ADN transferido), entre las secuencias LB (*left border*) y RB (*right border*), de modo que se insertan a la par en el genoma de la planta receptora, además, dada su proximidad, el gen de interés y el de resistencia a antibiótico generalmente segregan juntos. Por todo ello, se considera que la presencia de solo una copia del gen de resistencia en el genoma del parental transgénico es indicativa de que existe también una sola copia del gen de interés.

Para realizar el análisis de segregación, se esterilizaron semillas empleando una solución de lejía comercial al 5 % con unas gotas de Tween-20. A continuación se sembraron en 0,5X medio MS (Murashige y Skoog) (Murashige y Skoog, 1962) con 10

g/l de sacarosa y 8 g/l de agar (pH=5,8) y 50 mg/l higromicina, y se cultivaron durante 3 semanas bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 20 °C. Al cabo de ese tiempo se hizo un recuento (para las semillas que provenían de cada parental) de las semillas que habían sobrevivido al antibiótico y generado plántulas viables, y se observó si la proporción de plántulas resistentes respecto al número total de semillas sembradas coincidía con una proporción 1:3 (no resistentes:resistentes), indicando que su planta parental poseía una única copia del gen de interés.

Las semillas producidas por parentales con una copia del transgén fueron crecidas en tierra bajo unas condiciones de 16 horas de luz a 25 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C y sometidas a un *screening* por PCR como el comentado para las plantas parentales (apartado C₁ 3.4.2 del Capítulo 1 y apartado C₂ 3.4.2 del Capítulo 2), descartándose las que resultaron negativas. Las que resultaron positivas para el gen de interés fueron crecidas hasta que produjeron semillas (autopolinización). Estas semillas constituyeron la T₂, y al igual que en el caso de las semillas producidas por los parentales, una parte de ellas se destinó a la realización de un análisis de segregación (el procedimiento fue igual al ya comentado en este apartado). En este caso, el objetivo del análisis de segregación fue conocer qué semillas (T₂) provenían de plantas T₁ homocigotas, y por tanto eran todas ellas también homocigotas. Aquí el resultado buscado en el análisis de segregación era que la totalidad de las semillas sembradas resultasen resistentes al antibiótico.

A 4. Extracción de ARN de vid

El protocolo de extracción de ARN de vid que se describe a continuación se realizó empleando el kit RNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN).

Primeramente se trituró el material vegetal con un mortero en presencia de nitrógeno líquido. Tras la evaporación del nitrógeno líquido se añadieron 5 ml de tampón de lisis (4 M guanidina isotiocianato, 0,2 M acetato sódico (pH=5,0), 25 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), 2,5 % PVP-40 (polivinilpirrolidona de peso molecular medio 40,000), 1 % β-mercaptoetanol) y se continuó triturando el tejido hasta su total homogeneización. A continuación se transfirió 1 ml a un tubo, al que se añadieron 100 µl de Sarkosyl al 20 %, y se incubó a 70 °C durante 10 min, agitando vigorosamente de manera periódica. Tras la incubación se añadieron 650 µl de esta muestra en una columna QIAshredder Spin Column y se centrifugaron 2 minutos a 14000g. El paso de

A-Anexos

las muestras por estas columnas elimina gran parte de los restos celulares y a la vez mejora la homogeneización de las mismas. Seguidamente se transfirieron 250 µl del líquido que atravesó la columna a un nuevo tubo y se añadieron 225 µl de etanol (96-100 %). A continuación la muestra se pasó por una columna RNeasy Mini Spin Column centrifugando durante 1 minuto a 8000g y descartando el líquido que atravesó la columna, dado que el ARN queda ligado a la membrana de este tipo de columnas. Se añadieron 700 µl del tampón RW1 a la columna y se centrifugó durante 30 segundos a 8000g, para lavar su membrana. El siguiente paso consistió en otro lavado de la membrana de la columna mediante la adición de 500 µl de tampón RPE y centrifugación durante 30 segundos a 8000g. A lo que siguió un último lavado con 500 µl de tampón RPE. En este caso se centrifugó durante 2 minutos para que la membrana de la columna quedase totalmente seca. A continuación, se centrifugó de nuevo durante 1 minuto, para eliminar posibles restos de tampón que hubiesen quedado en la membrana. Por último, se colocó la columna sobre un vial de 1,5 ml y se añadieron sobre su membrana 30 µl de agua libre de ARNasas, seguidamente se centrifugó durante 1 minuto a 8000g para eluir el ARN.

A 5. Bibliografía

Fisher DK y Gultinan MJ. 1995. Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed-to-seed protocol. *Plant Mol Biol Report* 13: 278-289.

Karchi H, Shaul O y Galili G. 1994. Lysine synthesis and catabolism are coordinately regulated during tobacco seed development. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2577-2581.

Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Tizaoui K y Kchouk ME. 2012. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genet Mol Biol* 35: 640-649.

