



**Facultade de Ciencias**  
**Departamento de Bioloxía Celular e Molecular**

*Lignificación en cultivos celulares de  
gimnospermas basales*

Memoria presentada por la  
Lcda. Esther Novo Uzal  
para aspirar al grado de Doctor

**A Coruña, 2008**



Dña. M<sup>a</sup> JESÚS MANSO REVILLA, directora del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña

CERTIFICA:

Que la presente memoria, titulada "Lignificación en cultivos celulares de gimnospermas basales" y presentada por la licenciada ESTHER NOVO UZAL para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de A Coruña en colaboración con el Departamento de Biología Vegetal (U.D. Fisiología Vegetal) de la Universidad de Murcia.

Y para que conste firma la presente certificación en A Coruña a 17 de Diciembre de 2007.

Fdo. M<sup>a</sup> Jesús Manso Revilla



D. ALFONSO ROS BARCELÓ catedrático de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Murcia, Dña. M<sup>a</sup> ÁNGELES BERNAL PITA DA VEIGA, profesora titular del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de A Coruña y D. FEDERICO POMAR BARBEITO profesor contratado doctor del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de A Coruña

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada "Lignificación en cultivos celulares de gimnospermas basales" y presentada por la licenciada ESTHER NOVO UZAL, ha sido realizada bajo su dirección, y que cumple las condiciones exigidas para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que conste firman la presente certificación en A Coruña a 17 de Diciembre de 2007.



Alfonso Ros Barceló

M<sup>a</sup> Ángeles Bernal Pita da Veiga

Federico Pomar Barbeito



El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BOS2002-03550 y BFU2006-11577), y por la Fundación Séneca (CCAA Murcia) (00545/PI/04), con la ayuda de una beca de Tercer Ciclo (Universidad de A Coruña y Xunta de Galicia) y una beca-contrato predoctoral de la Universidad de A Coruña financiada por la Consellería de Innovación e Industria (Xunta de Galicia) dentro del programa María Barbeito.

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

### **Comunicaciones a congresos**

**Novo E, Gómez-Ros LV, Gabaldón C, Pedreño MA, Ros Barceló y Bernal MA.**

Caracterización de la peroxidasa básica de callos de *Ginkgo biloba*. Póster. “XVI Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y IX Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal”. Évora (Portugal), 18-21 Septiembre 2005.

**Novo Uzal E, Gómez Ros LV, Bernal MA, Merino F, Pomar F y Ros Barceló A.**

Lignification in plant cell cultures. Póster. “XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal”. Alcalá de Henares, 18-21 Septiembre 2007.

**Gómez Ros LV, Novo Uzal E, Bernal MA, Pedreño MA y Ros Barceló A.** Insights on the cell wall proteome in plant cell cultures. Comunicación oral. “XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal”. Alcalá de Henares, 18-21 Septiembre 2007.

Las secuencias peptídicas obtenidas en la presente Memoria han sido registradas en la base de datos UniProtKB con los siguiente números de acceso:

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85331** para Peroxidasa 1 en *Betula verrucosa* (GLTQKDLVALSGAHTIGKAR)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85332** para Peroxidasa catiónica en *B. verrucosa* (GFDVIDTIK)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85333** para Peroxidasa 2 en *B. verrucosa* (VVSCADILAVAAR)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85334** para Peroxidasa 3 en *B. verrucosa* (NLAPLDLQTPTAFDNNYYK)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85335** para Peroxidasa 4 en *B. verrucosa* (FYDTTCPK)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85336** para Cupina en *B. verrucosa* (ILGLNTLGVSLAR)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85351** para Peroxidasa en *B. verrucosa* (VALGGCLPTVQLGR)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85352** para Germina en *B. verrucosa* (AFQLDTNLVESLQK)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85353** para Germina en *B. verrucosa* (FSGLGSQNPGLLVLAK)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85354** para Germina en *B. verrucosa* (DFFFQGLNTPR)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85343** para Endoquitinasa 1 en *Ginkgo biloba* (GPLQLSWNYNYGAAGK)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85402** para Beclina 1 en *G. biloba* (GDAAA[Q/K]PEK)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85403** para Beta-fructofuranosidasa en *G. biloba* (NN[Q/K][L/I]NASHK)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85404** para Proteína de dedos de zinc en *G. biloba* (G[DV/IT]VANPESVE[L/I]K)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85405** para Proteína tipo kinasa en *G. biloba* (GSTTAESAA[L/I]R)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85406** para Histona-lisina N-metiltransferasa en *G. biloba* (PAVV[L/I])

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85407** para Ribulosa bisfosfato carboxilasa en *G. biloba* (STDA[L/I]SK)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85408** para Amelogenina en *G. biloba* (SE[Q/K][Q/K]CXXK)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85409** para Malato dehidrogenasa en *G. biloba* (ANDLVDDK)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85425** para Glucanasa en *G. biloba*

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85317** para Peroxidasa en *G. biloba*

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85346** para Peroxidasa 1 en *Cycas revoluta* (GFDVVDNIK)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85347** para Peroxidasa 2 en *C. revoluta* (DLVALSGAHTIGQAR)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85348** para Peroxidasa 3 en *C. revoluta* (MGQLNVLTGSKGEIR)



Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85349** para Peroxidasa 4 en *C. revoluta* (YYVDLQNR)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85431** para Peroxidasa 5 en *C. revoluta* (TQLEAACPNVSCADILALAAR)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85432** para Peroxidasa 6 en *C. revoluta* (AQVESVCPGVVSC)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85433** para Peroxidasa 7 en *C. revoluta* (FNALGLSTRDLVALSGAHTI GQAR)

Novo Uzal E, Gómez Ros LV y Ros Barceló A. **P85434** para Peroxidasa 8 en *C. revoluta* (ELVTLGAHTIGQAR)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85350** para Proteína p12 asociada a la patogénesis en *C. revoluta* (IVDYCPAGCR)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85360** para Citocromo P450 en *C. revoluta* ([M/F]NEY[L/I][L/I]P[K/Q])

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85361** para Antitransportador Na/H en *C. revoluta* ([F/M]GV[L/I]AVTSR)

Gómez Ros LV, Novo Uzal E y Ros Barceló A. **P85362** para 2-Isopropilmalato sintasa B en *C. revoluta* (FAQ[L/I][L/I]ND[L/I][K/Q])



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

En primer lugar a agradecer a mis directores de tesis, Ángeles Bernal Pita da Veiga, Alfonso Ros Barceló y Federico Pomar Barbeito, la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, su apoyo y orientación, y la confianza depositada en mí.

A la doctora Fuencisla Merino, por estar siempre dispuesta a resolver cualquier problema y por apoyarme.

A la doctora M<sup>a</sup> Ángeles Pedreño, por preocuparse constantemente, por implicarse y por acogerme como una más.

Al doctor José Díaz Varela, por solucionar todas mis dudas.

A la doctora Laura Gómez Ros, por ser fundamental para esta tesis, por compartir tantas y tantas horas, risas y desvaríos, por ayudarme cuando más perdida estaba y por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio. A Belén, Carmen y Silvia, por los viejos tiempos. A Jorge, por mimar (y salvar) mis callos de *Ginkgo* durante mi ausencia; por hablar alto y claro. A José Manuel, por soportar estoicamente mis peroratas vespertinas, y a pesar de todo, no dormirse y enseñarme. A Javi, por resolver cualquier problema informático y por tener más paciencia de la que debería.

A Lorena, por la compañía en las largas jornadas laborales (y festivas), por enseñarme muchísimas cosas, pero sobre todo, por su amistad.

A la gente de Murcia, tanto de dentro como fuera del laboratorio, de forma especial a Ana, Sarai, Carlos Gabaldón, Pepe, María del Mar, Sina y Damián, por la más que grata acogida, por hacerme reír tanto, por las vieirifias.

A los laboratorios de la Facultad de Ciencias que me ayudaron cuando lo necesité, especialmente a Bioquímica.

A Paula, por todo el trabajo realizado tan pacientemente con el nitrobenzeno. A Gerardo y Verónica, de la Unidad de Cromatografía de Servicios de Apoyo a la Investigación, por los análisis de tioacidolisis.

Al Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, en especial al Dr. Alberto Paradela; a la Plataforma de Proteómica del Parque Científico de Barcelona, en especial a las Dras Antonia Odena y Eliandre de Oliveira; y al Centro de Investigaciones Biológicas CIB, CSIC, Madrid.

A Patricia, por aportar su arte y diseñar la portada.

A todos mis amigos, a los de ahora y a los que se fueron quedando por el camino, por ayudarme a llegar hasta aquí. A Tamara, por escucharme pacientemente siempre que lo necesito y a Cris, por mantener durante tantos años una maravillosa amistad a pesar de la distancia, por estar siempre ahí.

A mi familia, de forma especial a mis padres, por su cariño, por apoyarme siempre y ayudarme en todo lo que he necesitado durante todos estos años.

*Índice*



INTRODUCCIÓN.....	1
<b>I. La pared celular vegetal.....</b>	<b>3</b>
I.1. Las proteínas de la pared celular interactúan con los componentes estructurales de la pared celular	5
I.2. Tipos funcionales de proteínas de la pared celular	7
I.3. Proteínas de secreción	8
I.4. Proteínas no canónicas de la pared celular	9
I.5. Avances en la proteómica de la pared celular	9
<b>II. Lignificación.....</b>	<b>10</b>
II.1. Naturaleza, composición y localización de las ligninas	12
II.2. Métodos de estudio de las ligninas	14
II.3. Diferencias entre las ligninas de gimnospermas y angiospermas	16
II.4. Biosíntesis de ligninas	19
II.4.1. Regulación transcripcional de la lignificación	22
II.4.2. La etapa de polimerización	24
II.4.3. Restricciones impuestas por el mecanismo de polimerización	27
II.4.4. Restricciones impuestas por la heterogeneidad de los monómeros	28
II.5. Lignificación de paredes celulares	30
<b>III. Peroxidasas.....</b>	<b>31</b>
III.1. Naturaleza y estructura	32
III.2. Funciones	34
III.3. Polimorfismo	34
III.4. Localización tisular y subcelular	35
III.5. Especificidad de sustrato	36
III.6. Papel fisiológico en la lignificación	39
<b>IV. Cultivos celulares.....</b>	<b>41</b>
IV.1. Uso de cultivos celulares como herramienta de investigación	42
IV.2. Lignificación en cultivos celulares	43
IV.3. Lignificación ectópica	44
 OBJETIVOS.....	 49
 MATERIAL Y MÉTODOS.....	 53
<b>I. Material vegetal.....</b>	<b>55</b>
I.1. Especies vegetales	55
I.2. Condiciones de recogida de las especies vegetales	57
I.3. Callos	57
I.3.1. Obtención y mantenimiento de callos	57
I.3.2. Caracterización del crecimiento de callos	61
I.4. Suspensiones celulares	61
I.4.1. Obtención de suspensiones celulares	61
I.4.2. Caracterización del crecimiento de suspensiones celulares	61
<b>II. Determinación de la actividad peroxidasa.....</b>	<b>62</b>
II.1. Fraccionamiento subcelular de la enzima peroxidasa en callos	62
II.2. Obtención de la proteína extracelular de suspensiones celulares	63

II.3. Obtención de la proteína del apoplasto de ápices	63
II.4. Medidas de la actividad peroxidasa	63
II.5. Efecto de inhibidores sobre la actividad siringaldazin-peroxidasa	64
II.6. Determinación de la cantidad de proteínas	64
<b>III. Análisis electroforéticos</b> .....	<b>64</b>
III.1. Isoelectroenfoque en equilibrio	64
III.2. Isoelectroenfoque en no equilibrio	65
III.3. Electroforesis disociante (SDS-PAGE)	66
<b>IV. Análisis de ligninas</b> .....	<b>67</b>
IV.1. Tinción de ligninas	67
IV.2. Obtención de paredes celulares	67
IV.3. Medida de ligninas	68
IV.4. Oxidación de las paredes celulares con nitrobenzeno	68
IV.5. Tioacidolisis	69
<b>V. Purificación de peroxidases</b> .....	<b>69</b>
V.1. Obtención de la proteína extracelular de suspensiones celulares y precipitación con sulfato amónico	69
V.2. Purificación parcial de peroxidases de <i>B. pendula</i>	70
V.2.1. Cromatografía hidrofóbica sobre Phenil- Sepharosa™ 6 Fast Flow	70
V.2.2. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sepharosa™ Fast Flow	71
V.2.3. Cromatografía de intercambio iónico sobre Q Sepharosa™ Fast Flow	72
V.3. Purificación de una peroxidasa básica de <i>G. biloba</i>	72
V.3.1. Cromatografía hidrofóbica sobre Phenil- Sepharosa™ 6 Fast Flow	72
V.3.2. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sepharosa™ Fast Flow	72
V.3.3. Cromatografía de intercambio iónico sobre Concanavalina A-Sepharosa	73
V.3.4. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sepharosa™ Fast Flow	73
V.4. Purificación de peroxidases de <i>C. revoluta</i>	73
V.4.1. Cromatografía hidrofóbica sobre Phenil- Sepharosa™ 6 Fast Flow	73
V.4.2. Cromatografía de intercambio iónico sobre Q Sepharosa™ Fast Flow	74
V.5. Medida del cociente de Reinheitszahl (Rz)	74
V.6. Efecto de reversión del HgCl <sub>2</sub>	74
<b>VI. Proteómica</b> .....	<b>74</b>
VI.1. Digestión de proteínas	74
VI.2. Adquisición de espectros de MS y MS/MS	75
VI.3. Secuenciación N-terminal de la peroxidasa de <i>G. biloba</i>	78
<b>VII. Técnicas bioinformáticas</b> .....	<b>79</b>
VII.1. Búsqueda de secuencias en las bases de datos	79
VII.2. Alineamiento de proteínas	79
VII.3. Búsqueda de secuencias homólogas	79
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>81</b>
<b>I. Estudio de la actividad peroxidasa en callos</b> .....	<b>83</b>
I.1. Caracterización del crecimiento de callos	83
I.2. Determinación de la actividad peroxidasa en callos	84
I.3. Isoenzimas	87



I.4. Determinación de la actividad peroxidasa en callos con otros sustratos	89
I.5. Caracterización de la actividad peroxidasa	92
<b>II. Estudio de la actividad peroxidasa en suspensiones celulares</b> .....	<b>94</b>
II.1. Caracterización del crecimiento de suspensiones celulares	94
II.2. Caracterización de la actividad peroxidasa en suspensiones celulares	95
II.3. Isoenzimas	97
II.4. Caracterización de la actividad peroxidasa	98
<b>III. Lignificación en cultivos celulares</b> .....	<b>100</b>
III.1. Localización histoquímica y citoquímica de ligninas	100
III.2. Determinación de ligninas en suspensiones celulares de angiospermas y gimnospermas por el método del bromuro de acetilo	102
III.3. Caracterización de ligninas en suspensiones celulares de angiospermas y gimnospermas mediante tioacidólisis. Relaciones H/G/S	102
III.4. Caracterización de ligninas en suspensiones celulares de angiospermas y gimnospermas mediante tioacidólisis. Monómeros estructurales y grado de polimerización	105
III.5. Caracterización de la composición monomérica de las ligninas mediante oxidación con nitrobenzeno	119
<b>IV. Enzimas implicadas en la oxidación de monolignoles y en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentes en el proteoma extracelular de suspensiones celulares de angiospermas y gimnospermas</b> .....	<b>123</b>
IV.1. Proteínas no canónicas de la pared celular	130
IV.2. Proteínas de función desconocida	132
<b>V. Purificación de peroxidases del medio extracelular de suspensiones</b> .....	<b>134</b>
V.1. Purificación parcial de las peroxidases del proteoma extracelular de <i>B. pendula</i>	136
V.2. Purificación y caracterización de la proteína más abundante en el proteoma extracelular de <i>G. biloba</i>	139
V.3. Purificación y caracterización de las peroxidases del proteoma extracelular de <i>C. revoluta</i>	150
CONCLUSIONES.....	163
BIBLIOGRAFÍA.....	169
ANEXO.....	201



## *Introducción*



## I. La pared celular vegetal

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

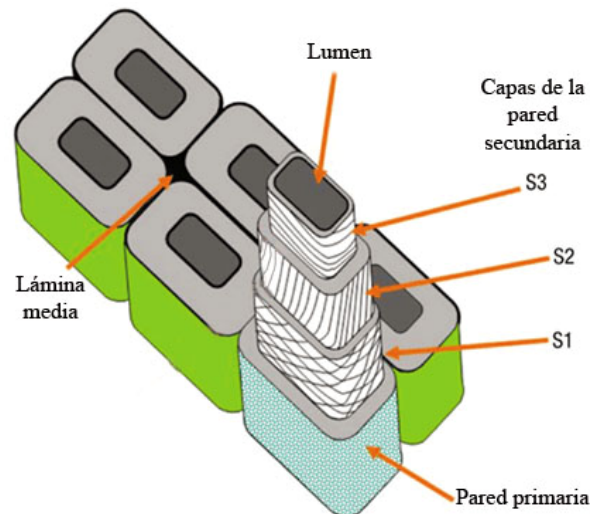
Los polisacáridos de la pared celular vegetal son los compuestos más abundantes encontrados en la naturaleza, constituyen alrededor de un 90 % de la pared celular vegetal, y se dividen en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectinas. Su composición varía de una especie a otra (dicotiledóneas/monocotiledóneas), pero también en diferentes tejidos de la misma planta (Heredia y cols. 1995, Cosgrove 1997, Popper y Fry 2003).

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

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

### *Lámina media*

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



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

### *Pared Celular Primaria*

Las células vegetales presentan dos tipos de paredes celulares: la pared celular primaria y la secundaria. La pared celular primaria se sintetiza durante el crecimiento y la elongación celular en los primeros estados del desarrollo, y está compuesta de celulosa, hemicelulosa, polisacáridos pécticos y muchas proteínas, entre ellas la extensina que puede llegar a constituir el 10%, y que es rica en hidroxiprolina y serina. Las microfibrillas de celulosa se encuentran entrecruzadas, lo que facilita el crecimiento y la extensión de la pared primaria. Existen dos tipos de pared celular primaria según la composición de sus polisacáridos. La de tipo I es la más común, mientras que la de tipo II es la típica de las gramíneas (Carpita 1996). Los polímeros no celulósicos de las paredes de tipo I son los xiloglucanos y, constituyendo alrededor del 35 % de la masa de la pared, las pectinas. Las paredes de tipo I se encuentran en todas las dicotiledóneas, en las monocotiledóneas no gramíneas y en las gimnospermas (Carpita y Gibeaut 1993). Las paredes de tipo II tienen un contenido bajo en pectina y en xiloglucano, y alto en arabinoxilano (Carpita 1996). Las paredes de tipo II también contienen mezclas de  $\beta$ -D-glucanos, y poseen puentes de ferúlico que entrecruzan las cadenas de xilano, y que no están presentes en las paredes celulares de tipo I.

### *Pared Celular Secundaria*

La pared celular secundaria se sintetiza al final del desarrollo y se deposita en células especializadas como los vasos y traqueidas (componentes del xilema), las esclereidas y fibras (componentes del esclerénquima). En comparación con la paredes primarias, las paredes secundarias contienen más celulosa, lo que les confiere una mayor cristalinidad, por lo que son más deseadas en la industria maderera (Minic y Jouanin 2006). Además de la celulosa, la pared secundaria suele contener otras sustancias como las ligninas en los vasos, las traqueidas y el esclerénquima; la

suberina en la capa del súber de la corteza; y las sales minerales (principalmente carbonatos y sílice) (Paniagua y cols. 1997). La pared celular secundaria comprende tres subcapas: S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> y S<sub>3</sub>, mencionadas de fuera hacia dentro (Figura 1.1). Estas subcapas son birrefringentes, pues a diferencia de lo que ocurre en la pared primaria, en cada una de ellas las microfibrillas de celulosa se disponen de una forma ordenada en varios planos de modo que, en cada plano, todas las microfibrillas son paralelas, cambiando la orientación de las fibrillas de un plano al siguiente (Paniagua y cols. 1997).

Durante la formación de la pared secundaria se sintetizan polisacáridos, como celulosas y hemicelulosas, además de proteínas específicas de la pared. Estudios moleculares han permitido identificar estas proteínas estructurales (Cassab y Varner 1988, Keller 1994, Northcote 1995, Blee y cols. 2001a, Hertzberg y cols. 2001, Kärkönen y cols. 2002, Brown y cols. 2005, Yokoyama y Nishitani 2006, Ubeda-Tomas y cols. 2007) que se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: proteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en glicina y proteína arabinogalactano (Fukuda 1996). Dentro de estas últimas, Motose y cols. (2001), identificaron una proteína de 25 kDa que mediaba la comunicación intercelular local requerida para la diferenciación de las traqueidas. Este factor fue denominado “xilógeno” haciendo referencia a su actividad inductora de la xilogénesis.

También se han detectado actividades de algunas enzimas hidrolíticas, como poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, fucosidasa y xiloglucano endo-transglicosilasa, que incrementan su actividad al final del proceso de diferenciación (Stacey y cols. 1995, Pesquet y cols. 2005).

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

### **I.1. Las proteínas de la pared celular interactúan con los componentes estructurales de la pared celular**

Las paredes celulares vegetales son estructuras complejas compuestas de polisacáridos y proteínas. Los modelos actuales describen la disposición de sus componentes en dos redes estructuralmente independientes que interactúan y que están embebidas en una matriz de pectina (Carpita y Gibeau 1993, Cosgrove 2000). Las microfibrillas de la celulosa y la hemicelulosa constituyen la red primaria y las

proteínas estructurales forman la red secundaria. Según Jamet y cols. (2006), se consideran proteínas de la pared celular todas aquellas secretadas al espacio extracelular, así como a las proteínas localizadas entre la membrana plasmática y la pared celular. Podemos distinguir tres tipos de proteínas de la pared celular de acuerdo a sus interacciones con los otros componentes de la misma:

1- Proteínas con poca o ninguna interacción con otros componentes de la pared celular, que se mueven libremente en el espacio extracelular. Estas proteínas son mayoritarias en el medio de cultivo líquido de suspensiones celulares y pueden ser extraídas con tampones de baja fuerza iónica. A esta fracción se le denomina “proteínas solubles”, y la mayoría de ellas tienen un punto isoeléctrico (pI) ácido, entre 2 y 6.

2- Proteínas unidas débilmente a la matriz por fuerzas de Van Der Waals, por puentes de hidrógeno o por interacciones hidrofóbicas o iónicas. Estas proteínas se pueden extraer mediante sales, y la mayoría de ellas tienen un pI básico, entre 8 y 11, de manera que están cargadas positivamente al pH ácido de las paredes celulares. Aunque la mayoría de los polisacáridos de la pared celular son neutros, las pectinas están cargadas negativamente debido a los ácidos poligalacturónicos, y estas cargas negativas favorecen las interacciones con las proteínas de alto pI. Tales interacciones son moduladas por el pH, el grado de interacción de las pectinas, la concentración de calcio, y los coeficientes de movilidad y difusión de estas macromoléculas (Varner y Lin 1989).

3- Proteínas unidas covalentemente a otros componentes de la pared celular, que no pueden extraerse con sales. Este es el caso de las extensinas que están unidas mediante enlaces covalentes (Brady y cols. 1996, Schnabelrauch y cols. 1996).

Las proteínas de la pared celular se encuentran embebidas en una matriz polisacáridica insoluble e interaccionan con otros componentes de la pared celular haciendo de su extracción un desafío. Los proteomas disponibles de la pared celular incluyen, fundamentalmente, proteínas unidas mediante enlaces débiles. Las proteínas unidas mediante enlaces débiles son extraídas de las paredes celulares con agentes quelantes o con sales. Estas proteínas se pueden perder durante la preparación de las paredes celulares y, además, deben ser extraídas de los tejidos por técnicas no destructivas como la infiltración a vacío (Boudart y cols. 2005) o recuperadas del medio de cultivo de una suspensión celular simplemente por centrifugación (Borderies y cols. 2003, Charmont y cols. 2005). Hasta ahora no existe ningún procedimiento eficiente que permita extraer las proteínas de la pared celular unidas covalentemente a la matriz extracelular. Las proteínas estructurales, como las extensinas, o las proteínas ricas en hidroxiprolina, se pueden unir mediante puentes isoditrosina (Brady y cols. 1996, Held y cols. 2004). Otra dificultad es la separación de los polipéptidos mediante electroforesis bidimensional. La mayoría de las proteínas de la pared celular son glicoproteínas básicas y son difíciles de separar con esta técnica (Rabilloud 2002). Más del 60% de las proteínas de la pared celular tienen un punto isoeléctrico entre 8,0



y 12,9 con una media de 8,5. Estas proteínas de pared incluyen sólo unas pocas proteínas estructurales, bien conocidas por su punto isoeléctrico básico. Las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (GPRH) se encuentran muy glicosiladas, son difíciles de detectar en los geles y son resistentes a proteasas. Tales proteínas requieren el desarrollo de métodos específicos de aislamiento y desglicosilación, como los utilizados para las extensinas y las proteínas arabinogalactano (PAG) (Schultz y cols. 2004).

**Tabla 1.1.** Clases funcionales de proteínas unidas a la pared celular mediante enlaces débiles. Las proteínas se agrupan en clases y subclases de acuerdo a su función biológica. Datos tomados de Jamet y cols. 2006.

<i>Clases funcionales</i>	<i>Porcentaje de proteínas identificadas en Arabidopsis</i>	
<b>Proteínas que actúan sobre los polisacáridos</b>	<b>29,5 %</b>	
Glicósido hidrolasas		21 %
Esterasas y liasas		5,5 %
Expansinas		3,0 %
<b>Oxido-reductasas</b>	<b>13,5 %</b>	
Peroxidasas		6,0 %
<b>Proteínas estructurales</b>	<b>1,5 %</b>	
<b>Proteínas implicadas en la señalización</b>	<b>8,0 %</b>	
<b>Proteasas</b>	<b>10,0 %</b>	
<b>Proteínas que interaccionan con dominios</b>	<b>10,0 %</b>	
Tipo lectina		2,5 %
Tipo LRR		3,5 %
Inhibidores de enzimas		3,0 %
<b>Otras</b>	<b>16,5 %</b>	
<b>Proteínas con función desconocida</b>	<b>10,0 %</b>	

## I.2. Tipos funcionales de proteínas de la pared celular

Alrededor del 90 % de las proteínas de la pared celular se pueden clasificar en diferentes categorías en base a sus funciones bioquímicas o biológicas (Tabla 1.1) (Jamet y cols. 2006). Sólo se ha demostrado experimentalmente la función bioquímica de un pequeño grupo de este tipo de proteínas, asumiendo así que las proteínas que comparten dominios conservados tienen la misma actividad. Entre ellas se encuentran las glicósido hidrolasas, las pectin esterasas y las liasas, las expansinas, las oxido-reductasas, las proteínas estructurales, la mayoría de las cuales son proteínas

arabinogalactano (PAG), y las proteínas implicadas en la señalización (Jamet y cols. 2006).

### I.3. Proteínas de secreción

Las proteínas clásicas de la pared celular presentan tres características que surgen de la naturaleza del mecanismo responsable de su transporte desde el citoplasma al espacio extracelular. Primera, las pre-proteínas poseen un péptido señal en el extremo N-terminal que es el responsable de conducir las al retículo endoplasmático (von Heijne 1990, Rapoport 1992), el primer orgánulo en la ruta de secreción (Vitale y Denecke 1999). El péptido señal no posee una secuencia de aminoácidos consenso, pero se caracteriza por presentar una región “n” cargada positivamente en el extremo N-terminal y una región “h” hidrofóbica central, seguida por una región “c” polar que contiene el sitio de rotura (Figura 1.2). Segunda, las proteínas clásicas de la pared celular no presentan el tetrapéptido KDEL o HDEL en el extremo C-terminal, secuencias conservadas de retención en el retículo endoplasmático, y que sirven para prevenir la secreción de las enzimas residentes en el lumen de este orgánulo (Vitale y Denecke 1999, Crofts y cols. 1999).

```

Q4W1I9      MSYHKSSGTTLMVPLFMLLISVNYFMSCN----AQLSTTFYD TTCPTALSTIRTSIRSSV 56
CAH10840    MMMRTLVCIGVMA---VLLCSIN-INAVN----GQLSSTFYAKSCP RVQSIKTVVKVQAV 52
P24101      MQFSSSITSFTW---TVLITVGCMLLCAFSDAQLTPTFYDTSCPTVTNIVRDTIVNEL 57
* . . . . . : * : : . : . . . . . : * : : * * * . : * * . . : : . : . :

Q4W1I9      SSNRRNAALVIRLLHFHDCFVNGCDASLLLSG----AGSERASPANDGVLGYEVIDAAKAA 112
CAH10840    AKEKRMGASLVRLLHFHDCFVNGCDGSILLDDNATFTGEKTAGPNANSARGFDVIDTIKTQ 112
P24101      RSDPRIAGSILRLLHFHDCFVNGCDASILLDNNTTSFRTEKDALGNANSARGFPVIDRMKAA 117
. : * . . : : * * * * * : * * * * * . . . : * . . . : * * * * * :

Q4W1I9      VERVCPGVVSCADILAVAARDASVAVGGPSWTVRLGRRDSTTSNAAQAATDLPRGNMVL 172
CAH10840    VEAACSGVVSCADILTIAARDSIVELQGPWTVM LGRRDPTASLSAANNNPSPASSLS 172
P24101      VERACPRTVSCADMLTIAAQQSVTLAGGPSWKVPLGRRDSLQAFDLANANLPAPFFFLP 177
** . * . * * * * * : * * * * * : . . . : * * * * * : * * * * * :

Q4W1I9      QLISNFANKGLN-TREMVVALSGSHTLGQARCIRFRGRIYNSTLR-----IEPNFNRSLS 225
CAH10840    TLITSFQNHGLS-TKDLVALSGAHTIGQSRCAFFRTRIYNESN-----INAAFATSVK 224
P24101      QLKANFKNVGLDRPSDLVALSGAHTFGKNQCRFIMDRLYNFSNTGLPDPPLNTTYLQTLR 237
* : * * * * . : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

Q4W1I9      QACPPPTGNDATLRPLDLVTPNSFDNNYRNLVTSRGLLISDQVLFNA-DSTDSI--VTEY 282
CAH10840    PNCPSAGGDNTLSPLDVVTPPTTFDNKYYSNLKVQKGLLHSDQQLFNG-GSTDSQ--VTY 281
P24101      GQCPRNGNQSVLVDFDLRTPLVFDNKYYVNLKEQKGLIQSDQELFSSPNATDTIPLVRAY 297
** * . : * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

Q4W1I9      VNNPATFAADFAAAMVKMSEIGVVTGTSGIVRTL CGNPS----- 321
CAH10840    STNQNSFFTFDFAAAMVKMGNISPLTGTSGQIRKNCRKAN----- 320
P24101      ADGTQTFFNAFVEAMRMGNITPTTGTQGGQIRLNCRVVNSNLLHHDVVDIVDFVSSM 354
. : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

```

**Figura 1.2.** Alineamiento de peroxidasas de *Zinnia elegans* (Q4W1I9), *Picea abies* (CAH10840) y *Arabidopsis thaliana* (P24101), mostrando la presencia del péptido señal (en letras rojas) y un propéptido C-terminal (en letras azules). Según estos péptidos, las peroxidasas de *Z. elegans* y *P. abies* son secretadas a la pared celular, mientras que la de *A. thaliana* se dirige a la vacuola.

En la ruta de secreción, las proteínas abandonan el retículo endoplasmático para dirigirse al complejo de Golgi donde se empaquetan en vesículas que se dirigen a la membrana plasmática, el sitio de secreción hacia la matriz extracelular. Las proteínas integrales de la membrana plasmática también se transportan a lo largo de esta ruta, pero son embebidas en la bicapa lipídica debido a la existencia de un dominio hidrofóbico que subsecuentemente se transformará en un dominio transmembrana de la proteína. La tercera característica de las proteínas clásicas de la pared celular es la ausencia de este dominio transmembrana en sus secuencias de aminoácidos y la ausencia de un propéptido C-terminal (Chivasa y cols. 2002) (Figura 1.2).

#### **I.4. Proteínas no canónicas de la pared celular**

Las proteínas no canónicas o no clásicas de la pared celular son todas aquellas proteínas conocidas previamente como proteínas intracelulares. La presencia de estas proteínas en la pared celular resulta confusa, ya que no poseen un péptido señal, el cual es necesario para dirigirse a la ruta de secreción, no estando clara su función en la pared (Slabas y cols. 2004).

#### **I.5. Avances en la proteómica de la pared celular**

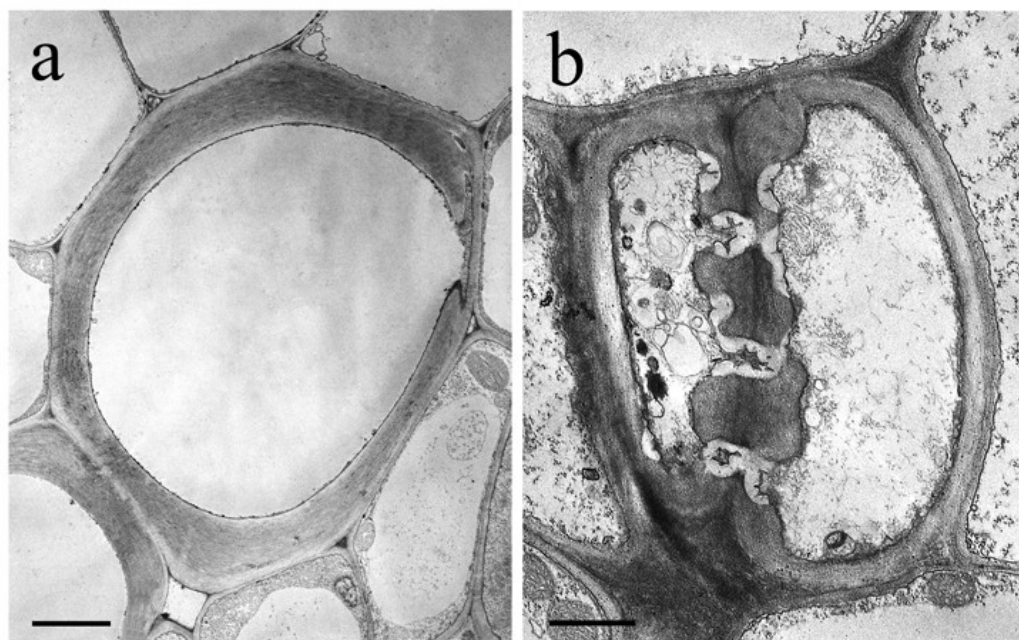
Hasta la fecha, la mayoría de los estudios proteómicos de las paredes celulares se han realizado con cultivos de células vegetales (Robertson y cols. 1997, Blee y cols. 2001a, Chivasa y cols. 2002, Ndimba y cols. 2003, Borderies y cols. 2003). Los cultivos celulares producen un aporte adecuado de material de la pared celular, aunque contienen principalmente células indiferenciadas de manera que no constituyen una fuente especial de proteínas de las paredes secundarias. Sin embargo, existen ciertos cultivos de células vegetales que presentan tanto paredes celulares primarias como secundarias. Este es el caso de los cultivos de *Zinnia elegans* (Miloni y cols. 2001), *Picea abies* (Kärkönen y cols. 2002) y *Nicotiana tabacum* (Blee y cols. 2001a).

Las técnicas de biología molecular y la secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* han contribuido enormemente a la descripción de muchas familias de proteínas de la pared celular (Bernier y Berna 2001, Welinder y cols. 2002, Xu y cols. 2004, Valerio y cols. 2004). La mayoría de las proteínas de la pared celular están codificadas por familias multigénicas. Sin embargo, el nivel de complejidad no puede abordarse usando sólo la transcriptómica (Peck 2005). Las aproximaciones proteómicas intentan dar no sólo una amplia visión de las proteínas presentes en un órgano particular en un estado de desarrollo dado, sino también resolver cuestiones más específicas. Existen varias revisiones recientes sobre proteómica vegetal que describen los métodos disponibles en este área y la aplicación de la proteómica en el estudio de las paredes celulares (Rose y cols. 2004, Lee y cols. 2004).

Durante los últimos tres años varios grupos de investigadores han usado las técnicas de la proteómica para identificar las proteínas de la pared celular de *Arabidopsis* en sus diferentes órganos. Estos estudios muestran las proteínas presentes pero se desconoce su abundancia relativa. En la actualidad, está surgiendo una visión más específica del proteoma de la pared celular al incluir en los estudios las posibles modificaciones post-traduccionales. Las investigaciones del genoma de *Arabidopsis* muestran que, aproximadamente, un 17 % (unos 5000 genes) del genoma codifica proteínas con un péptido señal que las conduce a la ruta de secreción. El grupo de “Genómica de la pared celular” de la Universidad de Purdue (IN, USA) ha agrupado los genes de *Arabidopsis* implicados en la formación y modificación de la pared celular, de los cuales 500 codifican proteínas extracelulares. Este número es muy bajo, ya que sólo se consideran las proteínas de la pared celular con funciones bioquímicas conocidas. Sin embargo, si se tienen en cuenta las múltiples formas de proteínas producidas por “splicing” alternativo y modificaciones post-traduccionales, se estima un número comprendido entre 1000 y 2000 proteínas diferentes (Jamet y cols. 2006).

## II. Lignificación

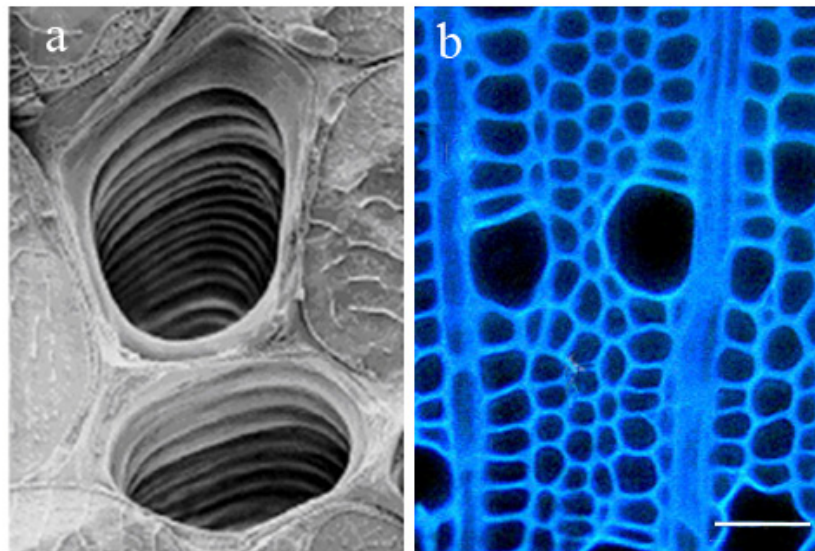
El xilema constituye una vía de baja resistencia para el transporte del agua en plantas vasculares. Este sistema transporta el agua eficazmente desde los lugares de absorción en la raíz hasta las superficies de evaporación en las hojas.



**Figura 1.3.** Imágenes de microscopio electrónico de un vaso del xilema de *Z. elegans* que ha perdido el citoplasma y en la que se aprecia las paredes celulares secundarias (a), y de un tubo criboso de la misma planta (b). Barras = 3  $\mu\text{m}$  (en a) y 1  $\mu\text{m}$  (en b).

La mayoría de las células terminales diferenciadas realizan funciones especializadas antes de morir pero, en el caso del xilema, la adquisición de la función implica la muerte celular. Así, las células conductoras no tienen membranas ni orgánulos, y lo que permanece son las paredes celulares engrosadas y lignificadas (Figura 1.3), que forman tubos huecos a través de los cuales el agua puede fluir con una resistencia relativamente baja (Kozela y Regan 2003).

Los elementos diferenciados del xilema (células conductoras de agua) se encuentran revestidos internamente de ligninas (del latín *lignum*: leño) (Figura 1.4), que son heteropolímeros fenólicos tridimensionales covalentemente asociados a la matriz polisacáridica de las paredes celulares (Anterola y Lewis 2002). Las ligninas también se encuentran en otros tejidos de sostén, tales como las fibras del floema y del xilema, y son el resultado de la polimerización oxidativa de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos, en una reacción mediada por lacasas (Liu y cols. 1994) y peroxidases (Ros Barceló 1997), que da lugar a un heteropolímero hidrofóbico ópticamente inactivo (Ralph y cols. 1999). Este proceso de sellado de las paredes celulares vegetales a través de la deposición de lignina, conocido como lignificación, proporciona fuerza mecánica a los tallos y protege a las fibras de celulosa de la degradación mecánica y biológica (Grabber y cols. 1998). En este contexto, la lignificación de la pared celular vegetal es uno de los principales factores restrictivos en el uso y reciclaje de la biomasa vegetal (Anterola y Lewis 2002).



**Figura 1.4.** Microfotografía electrónica de barrido del xilema de *Z. elegans*, cortesía de Kim Findlay (Roberts y McCann 2000) (a). Localización de las ligninas en el xilema de tallo de álamo, observado bajo luz ultravioleta. La autofluorescencia azul se corresponde con los depósitos de ligninas. La barra representa 50 $\mu$ m. Tomado de Ranocha y cols. 2002 (b).

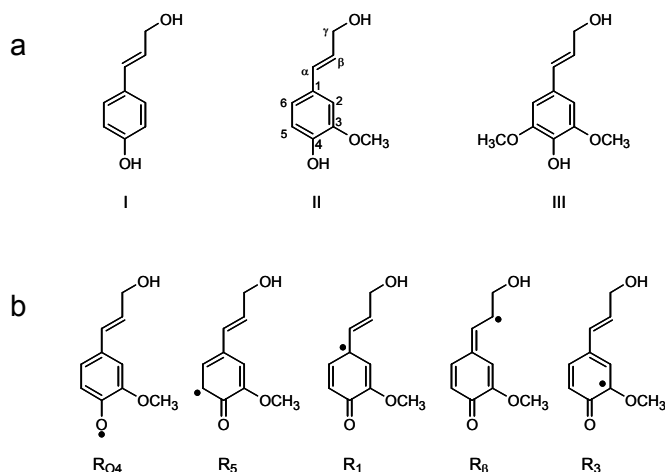
Las ligninas representan el compuesto orgánico más abundante sobre la superficie de la tierra después de la celulosa, y constituye alrededor del 25% de la biomasa vegetal (Higuchi 1990). Se encuentran principalmente en plantas vasculares

(Tracheophyta), y se localizan selectivamente en las paredes celulares secundarias de determinadas células, las cuales forman parte de tejidos leñosos, no sólo en los vasos del xilema y las traqueidas, sino también en las fibras y las esclereidas (Ros Barceló 1997). Las ligninas se han identificado en pteridofitas (helechos, licófitos, equisetos), ampliamente consideradas como las primeras plantas vasculares, y es posible que las ligninas hayan jugado un papel clave en la colonización del paisaje terrestre por las plantas durante la transición del Ordovícico al Silúrico, hace de 400 a 450 millones de años (Niklas 1997). Así, desde el punto de vista botánico, el fenómeno de la lignificación está asociado con la adquisición de la estructura vascular en las plantas.

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

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

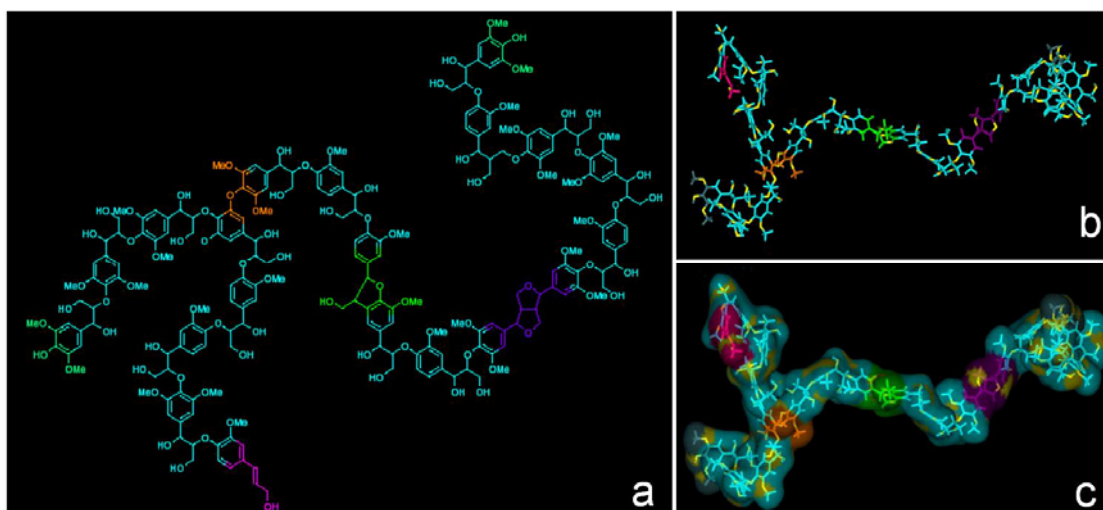
Las ligninas son heteropolímeros fenólicos y amorfos que resultan del acoplamiento oxidativo de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (Figura 1.5a): el alcohol *p*-cumarílico (I), el alcohol coniferílico (II) y el alcohol sinapílico (III), en una reacción mediada por las peroxidasas (Boudet y cols. 1995, Ros Barceló 1997).



**Figura 1.5.** Estructuras de los alcoholes *p*-cumarílico (I), coniferílico (II) y sinapílico (III) (a). Principales formas mesoméricas de los radicales del alcohol coniferílico formados durante la oxidación del mismo por la peroxidasas (b). Tomado de Ros Barceló y cols. 2004.

Esta reacción produce un heteropolímero hidrofóbico, ópticamente inactivo (Ralph y cols. 1999), compuesto por unidades H (*p*-hidroxifenilo), unidades G (guaiacilo) y unidades S (siringilo). El hecho de que los tres constituyentes monoméricos de las ligninas difieran en el grado de metoxilación (Figura 1.5a), y de que para cada uno de los tres bloques de construcción, el radical tenga, al menos, cinco formas mesoméricas (Figura 1.5b) sugiere que se pueden formar una gran cantidad de subestructuras durante la dimerización (Ros Barceló y cols. 2004),  $C_{m,n} = m(m+1) / n(n-1) = 120$ , donde  $m$  es el número de formas mesoméricas que son combinadas ( $m = 3 \times 5 = 15$ ) y  $n$  el grado de polimerización ( $n = 2$ ).

En las ligninas, las unidades fenilpropanoide están interconectadas mediante uniones éter y carbono-carbono (Ralph y cols. 2004b), que conducen a las principales subestructuras: aril-glicerol- $\beta$ -aryl éter, fenilcumarano, diarilpropano, resinol, bifenilo y éter difenilo, así como a otras de menor importancia (Figura 1.6). Los enlaces más frecuentes,  $\beta$ -O-4, se presentan en las subestructuras aril-glicerol- $\beta$ -aryl éter, que son las dianas de la mayoría de los procesos de despolimerización de las ligninas, incluyendo la tioacidolisis. Sin embargo, otros enlaces entre unidades tales como los  $\beta$ -5 (en las subestructuras fenilcumarano), los  $\beta$ -1 (en las subestructuras diarilpropano), los  $\beta$ - $\beta$  (en las subestructuras resinol), los 5-5 (en las subestructuras bifenilo) y los 5-O-4 (en los éteres difenilo), son muy resistentes a la degradación. Por lo tanto, a nivel químico, las ligninas son polímeros poco definidos cuya composición monomérica varía enormemente, como lo hace la naturaleza de sus enlaces entre unidades. Por ello, la expresión "ligninas" es preferible al uso de "lignina" ya que, probablemente, existe una gran diversidad de estructuras químicas dentro de las ligninas naturales (Boudet 1998). Este elevado grado de variabilidad estructural depende no sólo del tipo de especie y de tejido sino también del tipo de célula.



**Figura 1.6.** Estructura extendida de las ligninas de álamo mostrando los diferentes tipos de enlaces (a) y su configuración tridimensional (b y c). Cortesía de John Ralph (Universidad USDA, Madison, Wisconsin).

En cuanto a su localización, las ligninas se encuentran presentes en grandes cantidades en las paredes celulares secundarias de todas las plantas vasculares verdaderas, los helechos y, probablemente, en los musgos aunque en este último caso no pueda afirmarse con rotundidad. No obstante, las ligninas están ausentes en los musgos carentes de traqueidas y en las algas (Lewis y Yamamoto 1990).

Las ligninas se depositan mayoritariamente en las paredes celulares de un número limitado de tipos de células como son las traqueidas, los vasos, las fibras del xilema y del floema y las esclereidas. La naturaleza de las ligninas varía según el tipo de célula. Este hecho se observa de forma clara en el xilema de *Arabidopsis*, en el que predominan las ligninas de tipo G, mientras que en las células altamente lignificadas y adyacentes del esclerénquima existen fundamentalmente ligninas de tipo S (Chapple y cols. 1992).

De forma análoga, pueden apreciarse variaciones en la naturaleza de las ligninas encontradas dentro de una misma pared celular, siendo esta heterogeneidad observada durante la deposición de ligninas en la pared celular secundaria, apareciendo diferencias tanto en el contenido como en la composición monomérica media. En cuanto a variaciones en el contenido, Donaldson (1985) encontró que la concentración de ligninas era del 16-27% en la pared celular secundaria, mientras que en la lámina media de coníferas era más elevada, del orden del 38-88%. En lo referente a la composición monomérica, las ligninas depositadas en la lámina media y esquinas celulares son ricas en unidades H, predominando las unidades de tipo G en los engrosamientos secundarios (Terashima y Fukushima 1989).

## **II.2. Métodos de estudio de las ligninas**

Existen innumerables métodos para el estudio de las ligninas: unos orientados a detectar su presencia o determinar su localización, y otros a determinarlas cuantitativamente o a estudiar en profundidad su estructura y composición.

### *Pruebas histoquímicas y citoquímicas para la detección de las ligninas*

Debido al número extraordinariamente elevado de grupos funcionales que presentan, las ligninas son capaces de reaccionar con diversos reactivos químicos para dar lugar a un amplio espectro de reacciones de color, que han sido utilizadas en su detección cito e histoquímica. Así, entre las pruebas histoquímicas más comúnmente utilizadas, cabe destacar la reacción con azul de toluidina, el ensayo de Wiesner (específico para grupos cinamaldehído) y la reacción de Mäule (específica para grupos siringilo) (Strivastava 1966). Una característica de las ligninas es su autofluorescencia azul cuando se iluminan con luz de 330-380 nm (Figura 1.4b). Todas estas características han sido utilizadas para poder detectar y estudiar la presencia de ligninas en los distintos tejidos vegetales.



### *Métodos degradativos y analíticos en el estudio de las ligninas*

Probablemente, uno de los métodos más usados sea la extracción con bromuro de acetilo, desarrollado por Johnson y cols. (1961), que permite la detección de ligninas en pequeñas muestras de paredes (3-6 mg) de forma rápida y fácil. Sin embargo, este método presenta algunos problemas como es el hecho de que el bromuro de acetilo degrada los xilanos, polisacáridos muy abundantes en todas las plantas lignificadas, produciendo un aumento de la absorbancia en la región entre 270-280 nm, zona en la que se cuantifican las ligninas, lo que provoca que la cantidad de ligninas presentes en la muestra sea sobrevalorada (Hatfield y cols. 1999). Esta sobrevaloración puede evitarse bajando la temperatura de reacción a 50 °C y aumentando su duración de 2 a 4 horas, pequeños cambios que reducen la degradación de los xilanos, y la consecuente interferencia en la cuantificación de las ligninas (Hatfield y cols. 1999). A pesar de este problema, el método resulta bastante adecuado para el estudio rutinario de pequeñas muestras debido a su rapidez y sencillez.

Como ya se mencionó anteriormente, en la estructura de las ligninas existen una serie de enlaces que unen las diferentes subunidades. Entre ellos, los enlaces  $\beta$ -O-4 son muy numerosos y bastante lábiles, por lo que son el objetivo de muchos de los procesos de despolimerización. Sin embargo, los enlaces carbono-carbono son muy resistentes, especialmente los enlaces 5-5 bifenilo, que son propios de los dímeros de las subunidades guaiacilo, lo que explica que las maderas de las coníferas, ricas en unidades guaiacilo, sean difícilmente despolimerizadas (Adler 1977). Asimismo, otros enlaces como los  $\beta$ -5,  $\beta$ -1,  $\beta$ - $\beta$  o 4-O-5 son también muy resistentes a la degradación.

La conversión de los polímeros de lignina en fenoles de bajo peso molecular, por métodos degradativos, permite un método analítico de estudio de la composición de las ligninas y nos aporta información sobre la estructura de los polímeros originarios. Estos procesos degradativos, sin embargo, se desarrollan con bajo rendimiento debido, sobre todo, a la existencia de enlaces muy fuertes. En este punto, las ligninas se diferencian de otros biopolímeros como las proteínas, los polisacáridos o los ácidos nucleicos, los cuales contienen uniones lábiles, susceptibles de romperse bien química o enzimáticamente por la acción de hidrolasas.

Aunque los métodos degradativos han sido muy criticados por sus bajas eficacias, y por la formación potencial de artefactos, las descripciones más completas de los tipos y de los patrones de unión dentro de las ligninas se han conseguido gracias a procesos como la tioacidolisis, la acidolisis, la oxidación con permanganato o la hidrogenolisis (Lapierre y cols. 1995).

Probablemente los métodos degradativos más usados sean los de la oxidación con nitrobenzeno y óxido cúprico en medio alcalino. La oxidación con nitrobenzeno es bastante efectiva, pero todas las oxidaciones alcalinas tienen el problema de acortar las cadenas laterales de las ligninas, y no proporcionan información sobre sus grupos funcionales, ni sobre el tipo de enlace entre subunidades. Además, con muestras

suberizadas, existe un alto riesgo de interferencia entre las ligninas y otros fenoles de la pared que derivan en productos similares.

El método de la acidólisis preserva los esqueletos  $C_6C_3$  aportando mayor cantidad de información y menos interferencias; sin embargo, el rendimiento es relativamente bajo debido a reacciones colaterales. Estos problemas se solventan en la tioacidólisis, en la cual, se reemplaza el agua usada en la acidólisis por el etanotiol (EtSH), y el HCl por el trifluoruro de boro ( $BF_3$ ) eterato.

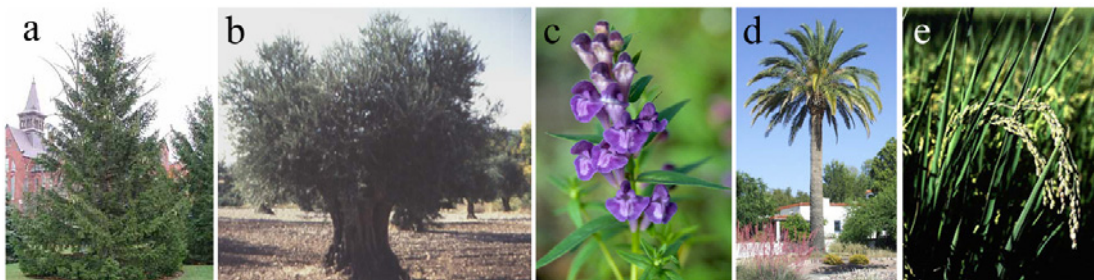
La tioacidólisis es una despolimerización ácida, que actúa mediante la escisión de los enlaces  $\beta$ -O-4. El método combina la acción de un ácido fuerte, el  $BF_3$  eterato, y un nucleófilo, EtSH. Sólo las unidades unidas por enlaces arilglicerol- $\beta$ -aril éter proporcionan monómeros fenilpropano  $C_6C_3$  con las cadenas laterales tioetiladas. Como la tioacidólisis degrada las ligninas a estructuras que mantienen las características de las cadenas originales, la determinación de los monómeros obtenidos, y sus cantidades, permite obtener gran cantidad de información sobre los grupos funcionales y la estructura de las ligninas. Los grupos benzaldehído, cinamaldehído y alcoholes cinamílicos implicados en los enlaces  $\beta$ -O-4 pueden ser estimados a partir de sus productos específicos de degradación. La tioacidólisis permite además acoplar reacciones complementarias como la per-metilación de las ligninas con  $CH_2N_2$ , que permitiría detectar grupos terminales libres, guaiacilo o siringilo, aportando una información importantísima sobre la arquitectura de la lignina. Así mismo, la desulfuración de las muestras una vez tioacidolizadas permite el análisis de los dímeros. Sin duda, la limitación más importante de la tioacidólisis es su aplicación a ligninas con una proporción baja de enlaces  $\beta$ -O-4, ya que los resultados obtenidos difícilmente pueden ser extrapolables al conjunto del polímero. En estos casos el uso complementario de la oxidación con nitrobenzeno constituye una herramienta muy útil.

### II.3. Diferencias entre las ligninas de gimnospermas y angiospermas

La mayor variación en la composición de los monómeros de las ligninas en las plantas vasculares se da entre los dos grupos principales de plantas con semillas. Así, en las gimnospermas, las ligninas están compuestas de unidades G, con una menor proporción de unidades H, mientras que en las angiospermas, las ligninas están compuestas de una proporción similar de unidades G y S (Higuchi 1990). Esta regla tiene sus excepciones, ya que existen gimnospermas en las que predominan las ligninas de tipo S, y angiospermas en las que las ligninas son principalmente de tipo G (Lewis y Yamamoto 1990). En las monocotiledóneas (Ralph y cols. 2004a), las ligninas son más complejas, ya que contienen cantidades importantes de ácido *p*-cumárico unido por enlaces éter (Ralph y cols. 1994).

El contenido relativo de unidades S/G no es la única diferencia que puede apreciarse entre angiospermas y gimnospermas, ya que también se observan

variaciones en la predominancia de los tipos de enlace. En este sentido, Lapierre y cols. (1995) han demostrado mediante la técnica de tioacidolisis que las ligninas de las angiospermas leñosas difieren en la proporción de enlaces  $\beta$ -O-4 de las ligninas presentes en las gimnospermas leñosas y en las herbáceas. Así, aproximadamente el 60-65% de las unidades  $C_6C_3$  en las ligninas de las angiospermas leñosas están unidas por enlaces  $\beta$ -O-4, mientras que este valor se reduce al 30% en el caso de las gimnospermas leñosas, siendo dicho porcentaje aún menor en las herbáceas (Figura 1.7). Por tanto, las ligninas de las gimnospermas leñosas están más ramificadas mediante enlaces carbono-carbono que las ligninas de las angiospermas leñosas.



**Figura 1.7.** Ejemplos de gimnosperma leñosa, *Picea abies* (a); angiosperma dicotiledónea leñosa, *Olea europaea* (b); angiosperma dicotiledónea herbácea, *Scutellaria baicalensis* (c); angiosperma monocotiledónea leñosa, *Phoenix dactylifera* (d); y de angiosperma monocotiledónea herbácea (gramínea), *Oryza sativa* (e).

En el caso de las gramíneas, Ralph y cols. (1994) han detectado cantidades significativas de ácido *p*-cumárico unido por enlaces éter a las ligninas. Billa y cols. (1996) han propuesto la presencia de un núcleo G-S en las ligninas de las herbáceas, similar al encontrado en las ligninas típicas de las angiospermas, y en donde las unidades H (procedentes del ácido *p*-cumárico) forman los puntos de anclaje con los polisacáridos de la pared celular. También se ha encontrado ácido ferúlico, que está unido por enlaces éter a los componentes hemicelulósicos, pero que también puede proveer puntos de crecimiento al polímero de lignina (Jacquet y cols. 1995). Así, se puede concluir que la complejidad química de las ligninas ha aumentado durante el curso de la evolución vegetal desde las especies más ancestrales, como las pteridofitas y las gimnospermas, hasta las especies más evolucionadas, como las monocotiledóneas.

También se ha encontrado que la presencia de ligninas acetiladas es mayor en las herbáceas que en otras angiospermas, y además, éstas no aparecen en las gimnospermas. Esta acetilación ocurre de manera más frecuente en las unidades S, aunque el papel de estas ligninas acetiladas todavía se desconoce (Del Río y cols. 2007).

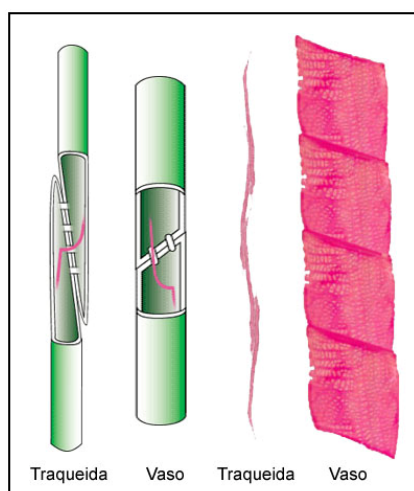
También se encuentran diferencias en la función realizada por las células del xilema. Así, en gimnospermas, las traqueidas del xilema participan tanto en el soporte mecánico como en el transporte de agua. En contraste, el xilema secundario de las

angiospermas leñosas contiene dos tipos especializados de células: los elementos de los vasos, que conducen el agua, y las fibras, que proporcionan soporte estructural. Esta segregación de la función en el xilema de las angiospermas produce una mayor eficiencia y economía. Esta eficiencia se muestra evidente en los pocos pero grandes elementos de los vasos, que muestran un contenido de lignina reducido (20% de materia seca) comparado con el de las gimnospermas (30% de materia seca). Un bajo contenido en lignina y alto en carbohidratos requiere significativamente menos energía, ya que se consume menos carbono en los sumideros vegetales (Amthor 2003). En las angiospermas, las células del xilema primario y los vasos conductores de agua del xilema secundario son ricos en ligninas tipo G, como las traqueidas de las gimnospermas más basales, mientras que las células de las fibras no conductoras del xilema son ricas en unidades S (Peter y Neale 2004).

El hecho de que las células conductoras de agua en las plantas con semilla estén compuestas principalmente de ligninas de tipo G, sugiere una fuerte presión selectiva para conservar la ruta de biosíntesis de estas ligninas, y su regulación, en las células conductoras del xilema durante la evolución de las plantas con semilla (Peter y Neale 2004). De hecho, evidencias moleculares sugieren que una ruta ancestral, predominante para la síntesis del alcohol coniferílico, se conservó entre las plantas con semillas, y que una ruta lateral, para la síntesis del alcohol sinapílico, evolucionó más recientemente en angiospermas (Peter y Neale 2004). Esta divergencia, aparentemente, ocurrió en las angiospermas basales, antes de la segregación de las monocotiledóneas de las eudicotiledóneas.

Durante la evolución de las plantas con semilla co-evolucionaron las diferencias en el conjunto de sustratos para la lignificación, no solo con la segregación de las funciones de transporte de agua y soporte, sino también con la forma/estructura de las células conductoras. El xilema de las gimnospermas está compuesto únicamente de traqueidas con un diámetro menor de 30  $\mu\text{m}$ , mientras que el xilema de las angiospermas está típicamente formado por vasos con grandes lúmenes (entre 100-200  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Brodribb y cols. 2005). Debido a que la conductividad hidráulica de los tubos es proporcional al valor del radio a la cuarta potencia (Sperry y cols. 2005), los vasos de las angiospermas son más conductores del agua que el xilema de las gimnospermas, y esto permite a las angiospermas mantener altas capacidades fotosintéticas (Figura 1.8) (Brodribb y cols. 2005). El gran potencial vegetativo y reproductor de las angiospermas conferido por los vasos (Brodribb y cols. 2005) fue, aparentemente, una de las razones de su radiación durante el Cretácico, la cual posiblemente tuvo una mayor influencia en el subsecuente descenso de la diversidad de las gimnospermas. Sin embargo, los grandes vasos también pueden convertirse en una desventaja debido a las frecuentes embolias que se producen durante la congelación/descongelación de los vasos del xilema (Sperry y cols. 2005), y esta es una de las razones por las que las familias de las gimnospermas todavía dominan muchas de las regiones templadas y la mayoría de las boreales, y de por qué el

bosque tropical y subtropical es el único donde las gimnospermas tienden a estar ausentes (Brodrribb y cols. 2005).



**Figura 1.8.** El xilema de las gimnospermas está compuesto de traqueidas con un diámetro menor de 30  $\mu\text{m}$ , mientras que el xilema de las angiospermas está típicamente formado por vasos con grandes lúmenes (entre 100-200  $\mu\text{m}$  de diámetro). Los vasos de las angiospermas son más conductores del agua que el xilema de las gimnospermas, y esto permite a las angiospermas mantener altas capacidades fotosintéticas.

#### II.4. Biosíntesis de ligninas

El proceso de la lignificación y la ruta de biosíntesis de las ligninas presentan numerosas incertidumbres referentes, fundamentalmente, al orden de la ruta y al mecanismo de dicho proceso. Algunas de dichas cuestiones ya fueron planteadas por Neish (1968) y muchas de ellas se mantienen hoy día sin resolver. Este desconocimiento parcial del proceso puede justificarse, en parte, si se considera la gran dificultad que entraña de por sí su estudio, hecho que queda patente si se tiene en cuenta la observación realizada por Sederoff y cols. (1994), quienes puntualizaron que no existe un tejido o especie vegetal donde se haya caracterizado completamente la ruta entera de la biosíntesis de las ligninas. Todo ello motiva que los conocimientos que se tienen actualmente sobre dicho proceso sean fragmentarios y hayan sido obtenidos del estudio concreto de ciertos pasos específicos en diversas especies y tejidos vegetales.

La biosíntesis de las ligninas (Figura 1.9) se desarrolla a través de una larga secuencia de reacciones que implican:

i) La ruta del sikimato, que produce L-fenilalanina y L-tirosina y que se inicia con fosfoenol piruvato (PEP, un intermediario de la glucólisis) y eritrosa 4-fosfato (un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato) (Herrmann 1995).

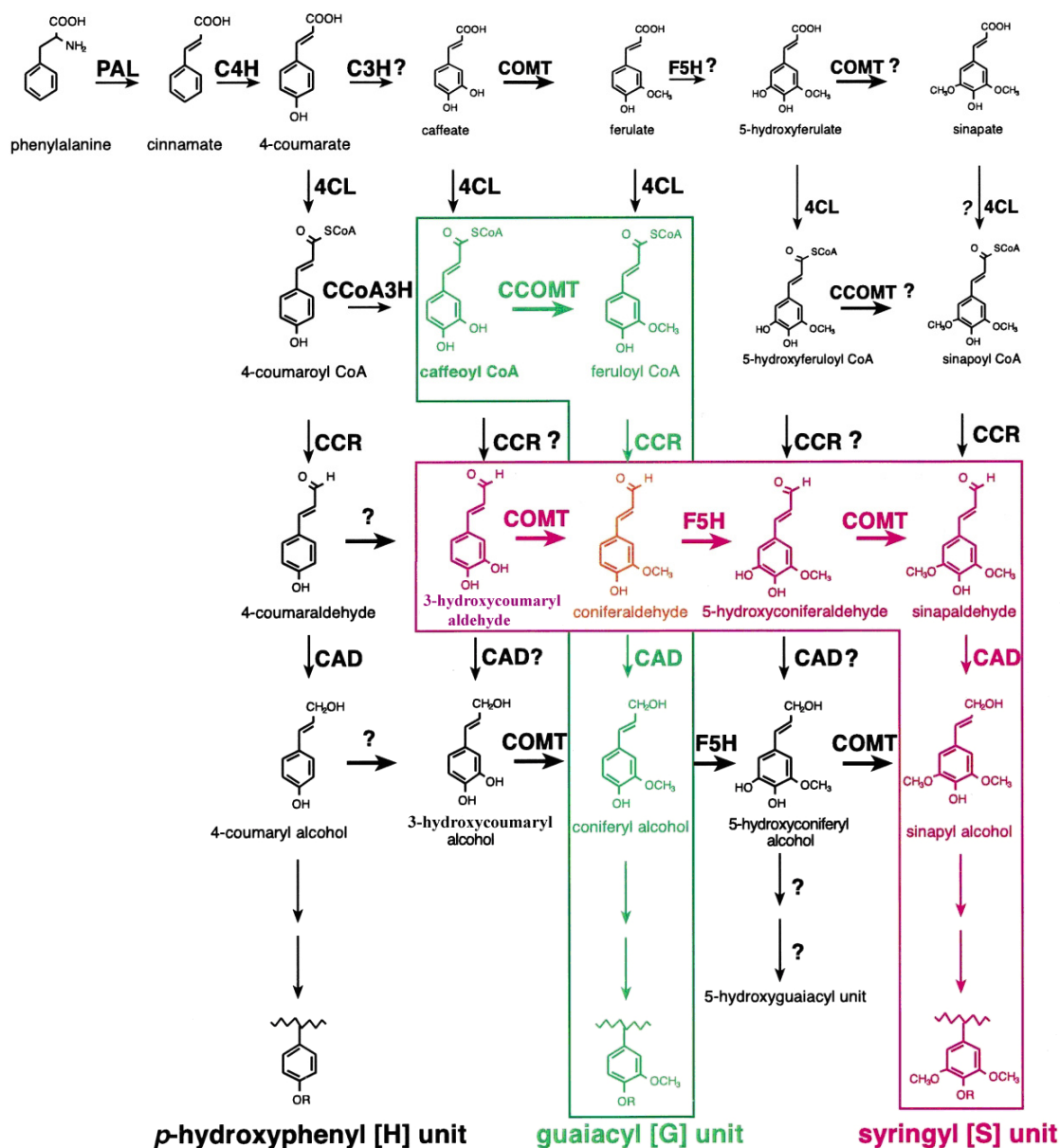
ii) La ruta común fenilpropanoide, desde L-fenilalanina (y/o L-tirosina) hasta *p*-hidroxicinamoil-CoA. Las enzimas que participan en esta ruta son la fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), la cinamato-4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.13.11), la *p*-cumarato-3-hidroxilasa (C3H), y las *O*-metil-transferasas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

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

iii) La ruta específica de la biosíntesis de las ligninas, que conduce el *p*-hidroxicinamoil-CoA hacia la síntesis de los alcoholes cinamílicos. Estas dos reacciones son catalizadas por las enzimas *p*-hidroxicinamoil-CoA reductasa (CCR, EC 1.2.1.44) y la *p*-hidroxicinamil alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.195) en sus formas coniferil alcohol deshidrogenasa (CAD) y sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD). Intercalada entre estos dos pasos reductores hay una reacción catalizada por la coniferilaldehído-5-hidroxilasa (CAld5H), que está acoplada con una OMT específica (AldOMT), y que permite la síntesis de unidades siringilo en las angiospermas (Osakabe y cols. 1999, Franke y cols. 2000, Li y cols. 2000).

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

Las plantas son los únicos organismos vivos capaces de conducir el carbono desde el metabolismo primario al secundario a través de la biosíntesis de ligninas, y se acepta que la adquisición evolutiva de la ruta fenilpropanoide ha jugado un papel clave en la capacidad de las plantas para colonizar la tierra, no solo porque uno de los productos de la ruta (las ligninas) sirve para fortalecer los órganos aéreos de la planta, sino también porque otros productos (los flavonoides) actúan como protectores contra la radiación UV. Para integrar esta nueva ruta evolutiva y la ruta general de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en el eficiente metabolismo de las plantas vasculares, las actividades de las enzimas de la ruta del sikimato están estrechamente coordinadas con las actividades de las enzimas de la ruta fenilpropanoide (Whetten y Sederoff 1995).

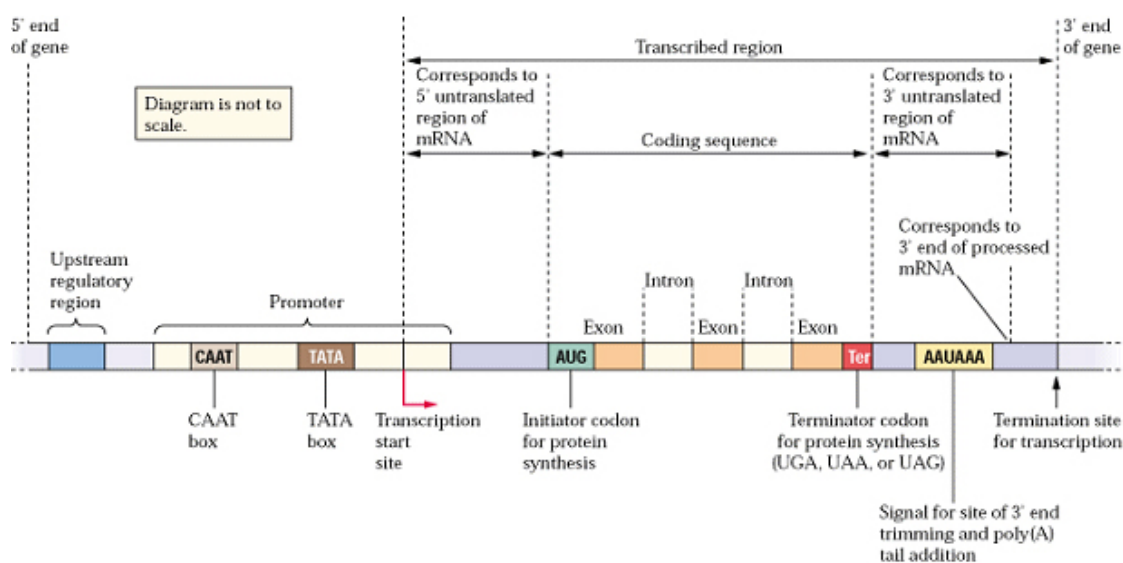


**Figura 1.9.** Rutas biosintéticas fenilpropanoide y de los monolignoles. Las reacciones en verde parecen las más probables para la ruta *in vivo* de las ligninas de tipo guaiacilo. Las reacciones en rojo representan aquellas reacciones para las cuales hay evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* de estar implicadas en la biosíntesis específica de unidades siringilo. El intermediario de color naranja es común a las rutas de ligninas G y S. CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; 4CL: 4-cumarato:CoA ligasa; C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; CCOMT: cafeoil-CoA-O-metiltransferasa; CCR: cinamoil-CoA reductasa; COMT: ácido caféico O-metiltransferasa; F5H: ferulato 5-hidroxilasa; PAL: fenilalanina amonioliasa; CCoA3H: cumaroil CoA 3-hidroxilasa. Modificado de Dixon y cols. 2001.

### II.4.1. Regulación transcripcional de la lignificación

Las células lignificadas constituyen un importante sumidero de carbono y además no pueden expandirse debido a la deposición de lignina, por lo que la lignificación debe ocurrir después de que la célula se haya dividido y aumentado de tamaño. Dado el coste metabólico de construir el polímero de lignina, junto con su persistencia y las propiedades de las células lignificadas, el momento y la localización de la lignificación deben estar fuertemente regulados. Las plantas incapaces de sintetizar cantidades normales de lignina pierden su capacidad de sostener su porte (Zhong y cols. 1997, Jones y cols. 2001) y en algunos casos, de defenderse frente a patógenos (Franke y cols. 2002).

La regulación de la biosíntesis de ligninas se ha estudiado principalmente mediante análisis de los promotores de los genes implicados (Devan y cols. 1989, Bell-Lelong y cols. 1997, Douglas y cols., 1991, Capellades y cols., 1996). Mediante análisis de delección en los promotores de los genes *PAL* y *4CL* (Hauffe y cols 1991, Levya y cols. 1992) se identificaron elementos *cis* críticos para la expresión específica en los distintos tejidos.



**Figura 1.10.** Estructura y organización de un gen eucariota. El gen se divide en varias secciones. La región transcrita actúa como molde para la síntesis de ARN, que se edita y traduce en el producto proteico del gen. La región trascrita contiene secuencias codificantes (exones) y secciones no codificantes (intrones). La región transcrita está flanqueada a ambos lados por secuencias no codificantes que actúan en la regulación del gen. La mayoría de los elementos de las secuencias reguladores están en la región 5'. Los primeros 1000 pb de la región 5' se denominan protomor, ya que contiene secuencias importantes para la “promoción” de la transcripción. Estos motivos se llaman “elementos *cis*”. El elemento *cis* más conservado es la caja TATA, que habitualmente se encuentra en los primeros 50 pb del punto de inicio de la transcripción. Tomado de Buchanan y cols. 2000.

Los elementos *cis* (Figura 1.10) son elementos localizados en la misma hebra que la región codificante del gen. El elemento *cis* más básico es la caja TATA,



presente en la mayoría de genes eucariotas y responsable de la correcta unión de la ARN polimerasa II para iniciar la transcripción. Otro elemento *cis* es la caja CAAT. Los genes inducibles casi siempre contienen una caja TATA y al menos otros dos elementos *cis* que juegan un papel importante en las etapas finales de la transducción de señales ambientales (Buchanan y cols. 2000).

Los elementos *cis* pueden actuar como activadores, contribuyendo a la eficiencia de la ARN polimerasa II en el inicio de la transcripción del gen. Los activadores pueden funcionar en cualquier orientación del cromosoma y estar localizados a una gran distancia de la región codificante del gen. Los activadores pueden regular la especificidad de expresión, dictando si un gen se expresa en un tejido u órgano. Esta función se mantiene aunque el activador se elimine de su contexto normal y se coloque en otro gen, donde se impone la expresión específica de tejido en el nuevo gen. En contraste con los activadores, los silenciadores disminuyen la expresión génica y son estructuralmente parecidos a los activadores (Buchanan y cols. 2000).

El análisis de la región reguladora 5' de varios genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de ligninas revela un motivo común. Los promotores de estos genes se caracterizan por la presencia de motivos conservados, conocidos como elementos AC, cajas H o cajas PAL (Bell-Lelong y cols. 1997, Lacombe y cols. 2000, Lauvergeat y cols. 2002). Estos motivos deben su nombre a que son ricos en citosina y adenosina, y se encuentran en los genes de PAL, C4H, COMT, CCoAOMT, 4CL, CCR y CAD. La ubicuidad de estos elementos en los promotores de estos genes sugiere que podrían actuar como una diana dentro de un mecanismo regulador común (Patzlaff y cols. 2003). Además de los elementos AC, existen otros elementos *cis*, como el elemento FP56 identificado en el promotor de 4CL, que también tienen importancia en la regulación de la expresión génica (Neustaedter y cols. 1999). De los 12 genes que se enumeran como participantes directos en la biosíntesis de ligninas en *Arabidopsis*, 10 de ellos contienen al menos una copia de un elemento AC (Rogers y Campbell 2004).

Existen factores de transcripción que interaccionan con los elementos AC y que podrían estar implicados en el control de la lignificación. La familia de factores transcripcionales MYB es una de las clases más abundantes en las plantas y la subfamilia que contiene el dominio R2R3 de unión al ADN es la más grande (Stracke y cols. 2001). Algunas proteínas R2R3-MYB que se unen a los elementos AC se hallaron en los promotores de varios genes del metabolismo fenilpropanoide (Grotewold y cols. 1994, Sablowski y cols. 1994) y se ha sugerido que estos motivos comunes podrían proveer un mecanismo por el que diferentes pasos del metabolismo fenilpropanoide se regulen de forma coordinada (Douglas 1996, Martin y Paz-Ares 1997, Weisshaar y Jenkins 1998). De hecho, muchas proteínas R2R3-MYB tienen funciones en la regulación de la biosíntesis fenilpropanoide y regulan la biosíntesis de compuestos fenólicos incluyendo la lignina (Borevitz y cols. 2000, Goicoechea y cols. 2005, Jin y cols. 2000, Patzlaff y cols. 2003, Tamagnone y cols. 1998).

El potencial de las proteínas R2R3-MYB de unirse a los elementos AC y regular la lignificación se demostró por primera vez en *Antirrhinum majus* (Tamagnone y cols. 1998). Cuando alguna de las proteínas *AmMYB308* o *AmMYB330* se sobreexpresa en tabaco transgénico se acumulan menos compuestos fenólicos que en las plantas controles y se reduce la cantidad de ligninas en los tejidos vasculares.

En *Pinus taeda* la proteína *PtMYB4* (Patzlaff y cols. 2003) es capaz de unirse y de activar la transcripción de los mismos elementos AC que se implican en la expresión en el xilema de los genes que codifican para las enzimas de la ruta de biosíntesis de las ligninas. De hecho, cuando se sobreexpresa, aumentan los transcritos de genes implicados en la biosíntesis de ligninas. Además, también se produjo lignificación ectópica en células que normalmente no lignifican.

Aunque estas proteínas son suficientes para inducir la lignificación, todavía se desconoce si son necesarias para la misma. Por ejemplo, dos factores transcripcionales MADS de *Arabidopsis* SHATTERPROOF (SHP)1 Y SHP2 son necesarios para la lignificación de las valvas de la silicua y son suficientes para incrementar la lignificación cuando se sobreexpresan en plantas transgénicas (Liljegren y cols. 2000)

Existen otros factores transcripcionales que tienen la capacidad de regular la expresión de algunos genes de la biosíntesis de ligninas. Se ha encontrado en tabaco un miembro de la familia LIM (*NtLIM1*) capaz de unirse a un elemento AC implicado en la expresión específica en el xilema de genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis de ligninas (Kawaoka y cols. 2000). La supresión de *NtLIM1* conlleva una disminución de los transcritos de varios genes implicados en la biosíntesis de ligninas y una reducción del contenido de lignina.

#### **II.4.2. La etapa de polimerización**

La etapa de polimerización es el último paso en el proceso de la biosíntesis de ligninas a partir de los alcoholes cinamílicos. Consiste en la oxidación, catalizada por las peroxidasas de clase III, de los alcoholes cinamílicos a radicales 4-O-fenoxilo que polimerizan espontáneamente para dar oligómeros y, en etapas subsecuentes, un polímero creciente de lignina (Higuchi 1990, Hapiot y cols. 1994). Dichos radicales fenoxilo pueden acoplarse entre ellos dando lugar a los diferentes bloques estructurales que aparecen en las ligninas naturales.

Los alcoholes hidroxicinamílicos son dimerizados y polimerizados en las paredes celulares del xilema en una reacción dependiente del  $H_2O_2$  (Nose y cols. 1995, Ros Barceló y Pomar 2001) suministrado por una enzima tipo NADPH oxidasa (Ros Barceló 1998a). Los dímeros de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (los dilignoles), no son los productos finales de la ruta y pueden ser oxidados por las peroxidasas para producir un polímero creciente de lignina que permanece anclado a la pared celular (Figura 1.11). Las ligninas se pueden unir a los polisacáridos de la pared celular por la

adición nucleofílica de los grupos hidroxilo de los polisacáridos a la estructura metiluro quinona que resulta del acoplamiento  $\beta$ -O-4 de dos radicales monolignoles. A través de este mecanismo, las ligninas aportan fuerza a las paredes celulares vegetales, facilitan el transporte de agua e impiden la degradación de los polisacáridos de la pared, actuando así como una mejor línea de defensa contra vertebrados herbívoros, insectos y hongos.

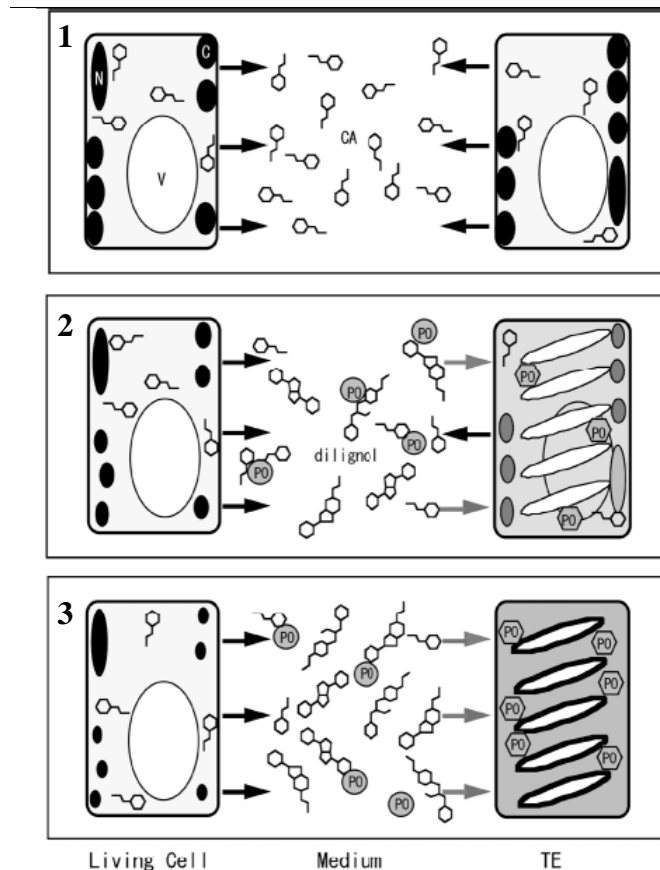
De forma general se ha considerado que las peroxidasas son las principales enzimas implicadas en esta etapa de polimerización, ya que presentan una correlación tanto espacial como temporal con la lignificación de la pared celular. No obstante, los resultados de diversos estudios realizados en los últimos años han motivado un resurgimiento de aquellas teorías en las que se sugería que otras enzimas, tales como las lacasas, podrían desempeñar un papel clave en los procesos de polimerización de los alcoholes cinamílicos (O'Malley y cols. 1993, Dean y Eriksson 1994).

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

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

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

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



**Figura 1.11.** Modelo de lignificación mediado por dilignoles durante la diferenciación a traqueidas de las células de mesófilo de *Z. elegans*. El alcohol coniferílico se secreta desde las traqueidas en diferenciación y las células parenquimáticas, y se acumula en el medio (1). Tras el inicio de los engrosamientos de la pared celular secundaria de las traqueidas, el alcohol coniferílico secretado se dimeriza rápidamente en dilignoles por las peroxidasas que se liberan al medio y/o se localizan en las paredes celulares secundarias de las traqueidas (2). Los dilignoles se polimerizan en ligninas por la peroxidasa unida a las paredes celulares secundarias de las traqueidas, incluso después de sufrir la muerte celular programada (3). N: núcleo; C: cloroplasto; V: vacuola; CA: alcohol coniferílico; PO: peroxidasa. Esquema tomado de Tokunaga y cols. 2005.

Muy pocas de las enzimas que actualmente se cree que pueden estar implicadas en la lignificación reúne todos estos requisitos antes mencionados. En el caso de las lacasas, éstas presentan una baja afinidad por los alcoholes cinamílicos, una incapacidad manifiesta de formar compuestos altamente polimerizados de tipo lignina y, en muchos casos, una falta de correlación cuantitativa entre los niveles de la enzima y la lignificación (Alba y cols. 1996). En el caso de las peroxidasas resulta difícil imaginar que una única isoenzima sea la responsable en exclusiva de un proceso tan complejo y organizado como es la polimerización de los alcoholes cinamílicos a ligninas. No obstante, las peroxidasas reúnen bastantes de los requisitos previamente definidos. Así, estas enzimas muestran una gran afinidad por los alcoholes cinamílicos durante su oxidación a compuestos de tipo lignina, muestran una correlación cuantitativa con la lignificación de la pared celular y, por último, están presentes en altos niveles en los tejidos lignificantes de todas las plantas vasculares.

### II.4.3. Restricciones impuestas por el mecanismo de polimerización

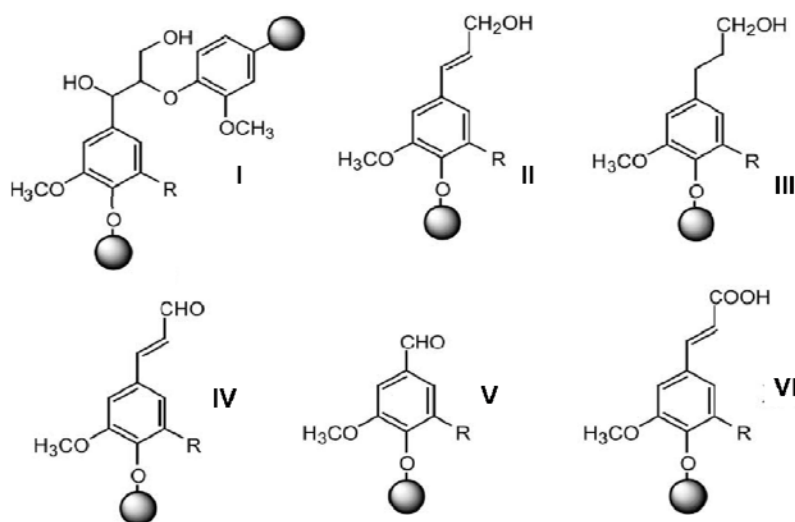
El mecanismo de polimerización, tal como actualmente es conocido (Freudenberg y cols. 1965, Hatfield y Vermerris 2001), impone ciertas restricciones al proceso de lignificación. Si los sustratos (los monolignoles y el  $H_2O_2$ ) son suministrados a las células del xilema por las células del parénquima vecinas, como parece probable (Hosokawa y cols. 2001, Ros Barceló y Pomar 2003), se puede esperar un gradiente de difusión de los bloques de lignina desde la membrana plasmática de las células del parénquima hasta las paredes celulares secundarias de los vasos del xilema. Este gradiente de concentración, probablemente, también ocurre para la peroxidasa que se concentra principalmente en la lámina media debido a sus propiedades de unión a las pectinas (Ferrer y cols. 1992, Carpin y cols. 2001), y cuyos niveles en las paredes celulares secundarias son bajos comparados con los niveles en las paredes celulares primarias. Esto produce dos zonas topográficas claramente definidas en las paredes celulares lignificantes:

- i) Una (caracterizada por elevados niveles de peroxidasa y alta difusión de sustratos) localizada en la pared celular primaria de las células del parénquima del xilema y de los vasos.
- ii) Otra (caracterizada por bajos niveles de peroxidasa y baja difusión de sustratos) localizada más allá de las paredes celulares primarias, por ejemplo, en los engrosamientos de la pared celular secundaria de los vasos del xilema.

Esto produce dos tipos de polimerización: una rápida (en la pared celular primaria) y la otra lenta (en la pared celular secundaria). La polimerización rápida, como probablemente ocurre en la lámina media y en las paredes celulares primarias, favorece el acoplamiento C-C de los monolignoles en polímeros muy ramificados, ricos en enlaces interunitarios  $\beta$ -5,  $\beta$ -1,  $\beta$ - $\beta$ , 5-5 y 5-O-4. En contraste, la polimerización gradual que ocurre en las paredes celulares secundarias, favorece el acoplamiento  $\beta$ -O-4 de los monolignoles en polímeros relativamente lineales (Lai y Sarkanen 1975), un proceso favorecido a pH 5,5 (Grabber y cols. 2003), el pH de la pared celular secundaria de los elementos del xilema (Roberts y Haigler 1994). El hecho de que estos dos tipos de polimerización ocurran en las paredes celulares lignificantes se apoya tanto en medidas *in situ* como en cálculos teóricos de la reactividad de los radicales. Así, las ligninas ricas en residuos H son depositadas principalmente en las paredes celulares primarias y están fuertemente entrecruzadas (Terashima y Fukushima 1988, Chabannes y cols. 2001, Ruel y cols. 2002), mientras que las ligninas ricas en residuos G y S son principalmente depositadas en las paredes celulares secundarias, y el polímero formado es principalmente lineal, en el que los esqueletos de los monolignoles se unen por enlaces  $\beta$ -O-4 (Chabannes y cols. 2001, Ruel y cols. 2002).

#### II.4.4. Restricciones impuestas por la heterogeneidad de los monómeros

Desde una perspectiva evolutiva, las ligninas están uniformemente distribuidas desde las pteridofitas y las gimnospermas primitivas hasta las monocotiledóneas más evolucionadas. Con muy pocas excepciones, la ruta de los monolignoles, que proporciona las ligninas en las pteridofitas y en las gimnospermas, sólo utiliza los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, mientras que en angiospermas la ruta biosintética de las ligninas se ramifica para usar el alcohol sinapílico como sustrato. La ruta biosintética de las ligninas, al menos hasta donde concierne a sus precursores, los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, está muy conservada a lo largo de la evolución de las plantas vasculares y, sólo en grupos recientes (las angiospermas), el alcohol sinapílico forma parte de los bloques estructurales. Sin embargo, los análisis por tioacidolisis y RMN (Resonancia Magnética Nuclear) de la fracción  $\beta$ -O-4 de la lignina de varias gimnospermas y angiospermas revelan la presencia de otros monómeros menores, además de los monolignoles principales, cuya presencia en una especie vegetal dada depende de su posición filética.

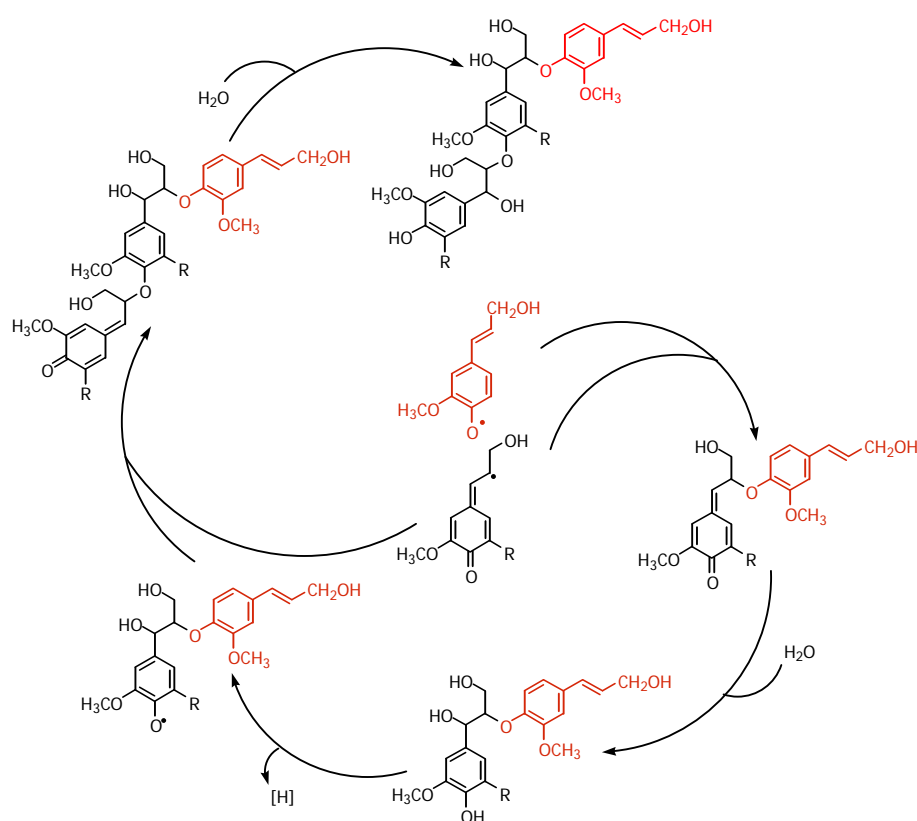


**Figura 1.12.** Estructuras de los monolignoles unidos por enlaces  $\beta$ -O-4 (I), monolignoles 4-O-terminales (II), dihidromonolignoles 4-O-terminales (III), *p*-hidroxicinamaldehídos 4-O-terminales (IV), *p*-hidroxibenzaldehídos 4-O-terminales (V), y ácidos *p*-hidroxicinámicos 4-O-terminales (VI) observados por tioacidolisis.

Así, aunque la mayoría de los bloques encontrados en las ligninas naturales son principalmente derivados de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos, la RMN confirma que los *p*-hidroxicinamaldehídos también se incorporan en los polímeros crecientes de lignina, siendo esto especialmente evidente en los mutantes de la CAD (Kim y cols. 2002). De hecho, la incorporación de los *p*-hidroxicinamaldehídos en las ligninas es un proceso bastante selectivo, en el que el sinapilaldehído forma enlaces  $\beta$ -O-4 con

unidades guaiacilo y siringilo, mientras que el coniferilaldehído sólo forma enlaces  $\beta$ -O-4 con unidades siringilo (Kim y cols. 2002).

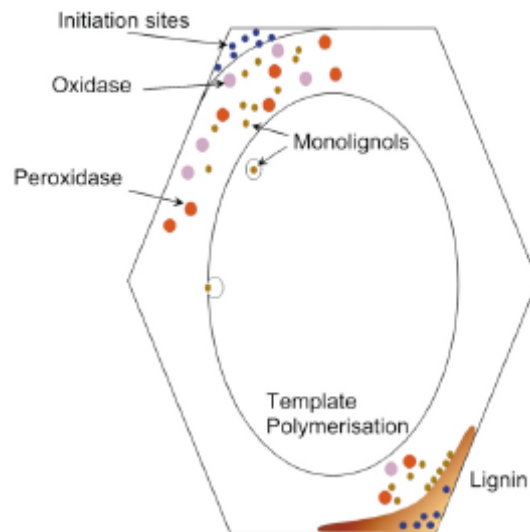
La tioacidolisis es capaz de revelar la presencia de componentes inusuales en las paredes lignificadas (Lapierre y cols. 1995; Ros Barceló y cols. 2003a). La mayoría de estos compuestos aparecen como unidades 4-O-terminales (Figura 1.12, II-VI), sugiriendo que la heterogeneidad en la composición monomérica de ligninas parece principalmente restringida a los enlaces 4-O-terminales, mientras que el núcleo lineal  $\beta$ -O-4 (Figura 1.11, I) está compuesto exclusivamente de alcohol coniferílico unido por enlaces  $\beta$ -O-4 (en gimnospermas) o por unidades intercaladas de alcohol coniferílico y sinapílico unidas por enlaces  $\beta$ -O-4 (en angiospermas). Estas unidades 4-O-terminales actúan como puntos de nucleación (iniciación) para el crecimiento de las ligninas (Figura 1.13), y surgen del enlace en la posición  $\beta$  de un radical monolignol (alcohol coniferílico o sinapílico) con la especie radical del grupo fenólico en la posición 4-O, al cual se unirían en pasos sucesivos los radicales de los alcoholes cinamílicos (Figura 1.13), permitiendo a la red de lignina crecer indefinidamente.



**Figura 1.13.** Flujo esquemático de la adición de los radicales coniferilo y sinapilo en la posición  $\beta$  a la especie radical del alcohol coniferílico en la posición 4-O. La red de lignina surge del acoplamiento de un radical monolignol en su posición  $\beta$  con otro radical monolignol en posición 4-O, de forma que el radical fenólico actuaría como punto de nucleación, al cual, se unirían en pasos sucesivos los radicales de los alcoholes cinamílicos.

## II.5. Lignificación de paredes celulares

El primer paso en la lignificación implicaría la secreción de los monolignoles en un proceso mediado por el aparato de Golgi (Samuels y cols. 2002). Estos monolignoles son oxidados por la acción de la peroxidasa y posteriormente polimerizan. La lignificación comienza en las esquinas celulares, la lámina media y la capa S1 de la pared secundaria, extendiéndose después por el resto de la pared secundaria hacia el lumen. La lignificación de la lámina media y la pared primaria comienza después de la formación de la pared secundaria, mientras que la lignificación de esta última normalmente empieza cuando la formación de la pared secundaria se ha completado, a juzgar por la presencia de una capa S3 (Donaldson 2001).



**Figura 1.14.** Esquema propuesto para la lignificación de las paredes celulares de las células del xilema. Los monolignoles se liberan a la pared celular desde el protoplasto y difunden hacia los sitios de inicio donde comienza la polimerización. La lignificación está mediada por enzimas tanto libres como ligadas a la pared y ocurre por la adición de monolignoles al polímero de lignina en un proceso conocido como polimerización molde. La naturaleza de los sitios de inicio y la forma en que se controla la cantidad y el tipo de lignina que se forma todavía se desconoce Tomado de Donaldson 2001.

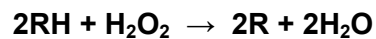
Debido a que la lignificación comienza en la región más alejada del protoplasto, se ha sugerido que haya puntos de inicio ligados a regiones específicas de la pared celular, donde comienza la polimerización (Figura 1.14) (Donaldson 1994). Las enzimas ligadas a puntos específicos en la pared celular podrían actuar como sitios de inicio, aunque el hecho de que tanto peroxidasas como oxidasas estén restringidas a las células lignificantes durante la formación del xilema, indica que estas enzimas no son en realidad sitios de inicio (Fukuda y Komamine 1982, Deighton y cols. 1999). De manera ideal, los sitios de inicio deberían estar en la pared durante su formación, en vez de depender de la difusión de las enzimas implicadas hacia los lugares de



lignificación. Aunque se sabe que estas enzimas están presentes en la pared celular que lignifica, apenas se tiene información sobre su localización exacta y cómo varía su distribución durante el proceso de lignificación. La localización ultraestructural de las enzimas es necesaria para confirmar su papel en el control de la química de la superficie celular. Otros candidatos para ser sitios de inicio son las proteínas dirigidas, proteínas ricas en hidroxiprolina (HRPs) y los polisacáridos de la pared celular (Davin y Lewis 2000, Müsel y cols. 1997, Terashima y cols. 1995, 1996).

### III. Peroxidasas

Las peroxidasas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ : donador de hidrógeno:  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidorreductasas) son hemoproteínas que catalizan la oxidación monoeléctrica de diferentes sustratos a expensas del  $\text{H}_2\text{O}_2$  :



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

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

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

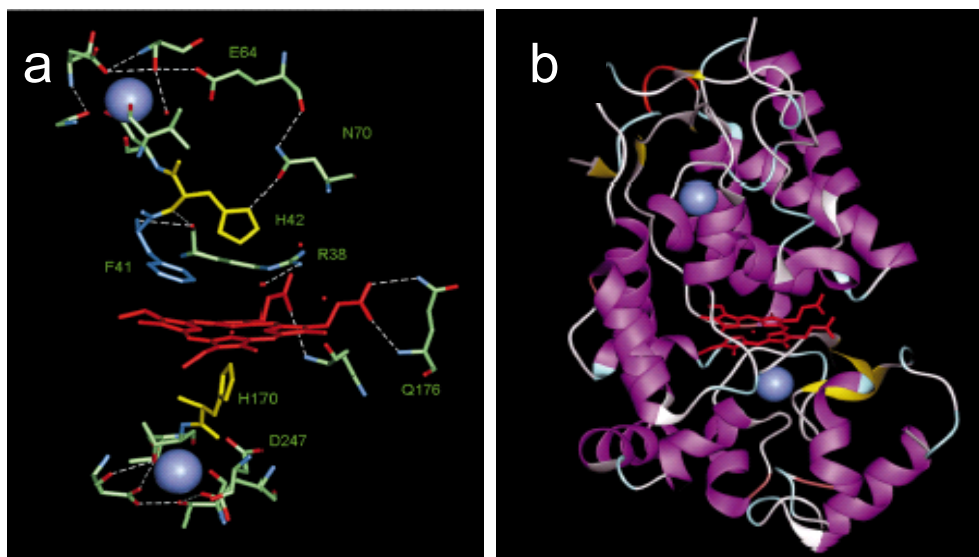
- Clase II: agrupa a todas las peroxidasas fúngicas de secreción (manganeso peroxidasas).

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

notable, afinidad por el alcohol coniferílico, además de presentar una inusual estabilidad térmica. Todas estas características las distinguen de las ascorbato peroxidasas vegetales (clase I).

### III.1. Naturaleza y estructura

Las peroxidasas vegetales de secreción (EC.1.11.1.7) son glicoproteínas cuyo peso molecular generalmente está comprendido entre 28 y 60 kDa (Hiraga y cols. 2001). Contienen como grupo prostético una molécula de protohemo IX (hemo b). En su estado nativo, el átomo de hierro se encuentra en el estado de oxidación formal +3 [Fe(III)]. Este hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno pirrólicos del grupo hemo y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina de la proteína, que se ha conservado durante la evolución. La sexta posición de coordinación se encuentra libre determinando así el estado de alto espín para el hierro (Banci 1997). El grupo prostético (Figura 1.15) resulta esencial para la actividad enzimática ya que su eliminación provoca la total inactivación de la enzima (Chibbar y cols. 1984).



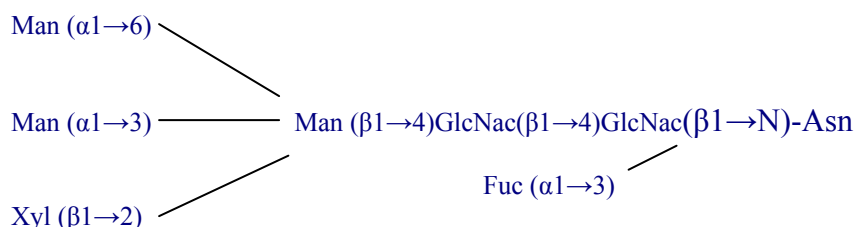
**Figura 1.15.** Ordenación espacial del centro activo de las peroxidasas. El grupo hemo (en rojo) esta coordinado por la histidina proximal, H170, y el sexto sitio de coordinación está vacante (a). Estructura tridimensional de la isoenzima C de la peroxidasa de rábano (HRP C); las regiones plegadas helicoidalmente se muestran en púrpura, y las láminas- $\beta$  en amarillo (b). El grupo hemo se encuentra entre los dominios distal (arriba) y proximal (abajo) de la enzima. Los dos sitios de unión al calcio se muestran como esferas azules. Tomado de Smith y Veitch 1998.

En su estructura tridimensional tienen 10 hélices  $\alpha$  y algunas láminas  $\beta$ . El grupo hemo está localizado en una cavidad entre dos hélices  $\alpha$  antiparalelas. Hay residuos conservados que tienen un papel importante, como la histidina distal y la arginina adyacente; y la histidina proximal y el hidrógeno unido al ácido aspártico.

En todas las peroxididasas de clase III conocidas hasta el momento se encuentran dos átomos estabilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además de tener estos efectos estabilizadores sobre la estructura plegada, el  $\text{Ca}^{2+}$  también es considerado un activador de las peroxididasas vegetales de secreción (Iori y cols. 1995, Converso y Fernández 1996). Las cadenas a las que están unidos están altamente conservadas (Welinder y cols. 2002).

Los ADN complementarios (ADNc) que codifican la peroxidasa han sido aislados de varias especies vegetales (Bartonek-Roxa y cols. 1991, Tyson y Dhindsa 1995), entre ellas *Arabidopsis thaliana* (Østergaard y cols. 1996), *Zea mays* (Teichmann y cols. 1997), *Ipomoea batatas* (Huh y cols. 1997), *Asparagus officinalis* (Holm y cols. 2003), *Solanum tuberosum* (Huh y cols. 1997), *Phaseolus vulgaris* (Blee y cols. 2001b), *Z. elegans* (Gabaldón y cols. 2005), *Picea abies* (Marjamaa y cols. 2006a) y *Catharanthus roseus* (Kumar y cols. 2007).

La clonación, expresión y análisis de los ADNc y los ADN genómicos de las peroxididasas de plantas superiores se ha llevado a cabo con éxito en varias ocasiones (Fujiyama y cols. 1990, Botella y cols. 1993, Hiraga y cols. 2000a, Ito y cols. 2000, Carpin y cols. 2001, Christensen y cols. 2001, Collinge y Boller 2001, Fossdal y cols. 2001, Cheong y cols. 2002, Yoshida y cols. 2003). La mayoría de los ARNm de las peroxididasas vegetales codifican un péptido señal de entrada al retículo endoplásmico que dirige a la proteína hacia la ruta de secreción. Algunos ARNm, como en el caso de la peroxidasa de rábano C y la peroxidasa 1 de cebada, también poseen un propéptido carboxi-terminal que puede ser responsable de su deposición en las vacuolas (Welinder 1992, Carpin y cols. 1999).



**Figura 1.16.** Estructura del glicano mayoritario de la isoenzima C de la peroxidasa de rábano (HRP). Tomado de McMannus y Ashford 1997.

La glicosilación de la enzima varía entre el 0 y el 25 %, siendo los principales azúcares la *N*-acetilglucosamina, la manosa, la fucosa y la xilosa. La mayoría de los oligosacáridos tienen un alto contenido en manosa (Figura 1.16) (Gray y cols. 1996, Yang y cols. 1996, McMannus y Ashford 1997, Wilson 2002). La glicosilación ocurre en la superficie de los giros que conectan las hélices, de tal forma que el glicano se presenta hacia el exterior de la molécula (Veitch 2004). La glicosilación es uno de los factores principales que determinan la inusual estabilidad térmica de las peroxididasas vegetales de secreción (McEldoon y Dordrick 1996) ya que la eliminación de estos

oligosacáridos normalmente afecta la cinética de las peroxidasas, su estabilidad térmica, su resistencia a las proteasas (por ejemplo tripsina), su estructura secundaria, y sus propiedades inmunológicas (Sánchez-Romero y cols. 1994, Tams y Welinder 1995, Duarte-Vázquez y cols. 2003).

Otros elementos estructurales importantes son los cuatro puentes disulfuro ligados a los pares de residuos invariables de cisteína y un puente salino importante para la unión entre los dominios N- y C- terminal, en los residuos invariables de Asp y Arg (Veitch 2004).

### **III.2. Funciones**

Las peroxidasas pueden considerarse como enzimas bifuncionales, ya que oxidan varios sustratos en presencia de peróxido de hidrógeno, pero también producen especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo y oxidativo) (Passardi y cols. 2005). Su implicación en procesos fisiológicos y de desarrollo puede detectarse desde la germinación hasta la senescencia. Participan en la germinación (Bellani y cols. 2002), crecimiento celular (Cosgrove 2001), metabolismo de hormonas (Grambow y Langenbeck-Schwich 1983, Normanly y cols. 1995), defensa frente a patógenos (Kristensen y cols. 1999, McLusky y cols. 1999), suberización (Bernards y cols. 1999), polimerización de extensinas (Brownleader y cols. 1995), dimerización de ferulatos (Ikegawa y cols. 1996), oxidación de fenoles (Lagrimini 1991) y especialmente en la lignificación (Mäder 1992, Quiroga y cols. 2000).

### **III.3. Polimorfismo**

La principal razón en la dificultad de asignar una función específica a una peroxidasa en particular ha sido la alta redundancia encontrada en los genes de las peroxidasas, el amplio espectro de sustratos susceptibles de ser oxidados y las propiedades inmunológicas muy similares de las diferentes isoenzimas (Christensen y cols. 1998)

Las peroxidasas vegetales de secreción son un grupo de enzimas que muestran un alto grado de polimorfismo, cuya extensión puede ser fácilmente estudiada mediante enfoque isoeléctrico. De acuerdo con su punto isoeléctrico (pI), las isoenzimas de la peroxidasa se clasifican en ácidas ( $pI < 7.0$ ), moderadamente básicas ( $7.0 > pI < 9.0$ ) o fuertemente básicas ( $pI > 9.0$ ) (Ros Barceló y cols. 1997, Ros Barceló y Pomar 2001, Quiroga y cols. 2000). Estos distintos grupos muestran una diferente localización subcelular pero una especificidad de sustrato similar.

Las peroxidasas vegetales de clase III están codificadas por una gran familia multigénica (Hiraga y cols. 2000b) y además, estas enzimas muestran un alto grado de polimorfismo. En la mayoría de los casos, el polimorfismo varía con el cultivar y con el

órgano de la planta. En las plantas superiores se han encontrado entre 8 y 15 familias de peroxidasas, algunas de las cuales contienen dos o tres genes muy similares (Welinder 1992). En rábano se han secuenciado nueve genes distintos que comparten entre el 50-95 % de homología. Sin embargo, la resolución de isoenzimas de la peroxidasa de rábano por isoelectroenfoque revela la existencia de 42 isoenzimas (Hoyle 1977). Esto indica que más de una de las posibles isoenzimas determinadas por isoelectroenfoque pueden originarse a partir de un mismo gen, de modo que su origen debe radicar en los diferentes patrones de glicosilación resultantes de las modificaciones post-transcripcionales (Green y Oliver 1991). Otra fuente de polimorfismo y heterogeneidad puede provenir de las modificaciones covalentes o alteraciones conformacionales, incluyendo alteraciones alostéricas con componentes de bajo peso molecular, por ejemplo los fenoles presentes en la célula vegetal (Ros Barceló y cols. 1987). Estas interacciones también pueden modificar sus propiedades catalíticas (Ros Barceló y Muñoz 1989), ampliando así su papel metabólico.

Desde la aparición de las peroxidasas de clase III, justo después de la colonización del medio terrestre, hasta las angiospermas, el número de copias génicas se ha incrementado mucho. Esto puede relacionarse con la adaptación de las plantas a la vida terrestre en la presencia de elevadas concentraciones de oxígeno. La evolución de una familia multigénica parece estar relacionada con el aumento de la complejidad de las plantas y con la diversificación de sus biotopos y patógenos (Passardi y cols. 2004b). En algunas plantas, una alta tasa de duplicación ha llevado a grandes familias multigénicas, como sugiere la presencia de 138 genes que codifican peroxidasas en *Oryza sativa* (Passardi y cols. 2004a), o los 73 de *Arabidopsis thaliana* (Tognolli y cols. 2002). Estos 73 genes de *A. thaliana* se han usado para determinar relaciones filogenéticas entre las peroxidasas del reino vegetal (Duroux y Welinder 2003). Estos estudios parecen indicar que las peroxidasas de clase III aparecieron con la colonización de la tierra por parte de las plantas.

#### III.4. Localización tisular y subcelular

Probablemente, para compensar su amplia especificidad de sustrato, la peroxidasa es una enzima que presenta una compartimentalización tisular muy específica. Así, la peroxidasa está localizada en los tejidos meristemáticos (Crevecoeur y cols. 1997), en las células epidérmicas (Goldberg y cols. 1987, Hendriks y van Loon 1990, Ferrer y Ros Barceló 1994a) y vasculares (Czaninski y Cateson 1969, Ros Barceló y cols. 2002). En las células vasculares, la peroxidasa puede estar localizada en el xilema (Ferrer y Ros Barceló 1994b) y, secundariamente, en las células del cambium y del floema. En los frutos, la peroxidasa está fundamentalmente localizada en las células epidérmicas y del xilema (Calderón y cols. 1993); y en las hojas, la peroxidasa también está compartimentalizada en las células del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló 1997).

En todos estos tejidos, la peroxidasa se encuentra localizada tanto en las paredes celulares como en las vacuolas. Sin embargo, en las células meristemáticas (Crevecoeur y cols. 1997), cambiales (Ros Barceló y cols. 1991) y del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló 1997), las peroxidasas están principalmente localizadas en la vacuola, bien en forma soluble (Crevecoeur y cols. 1997) o bien firmemente ligadas a la cara interna del tonoplasto (Ros Barceló y cols. 1991, Sottomayor y Ros Barceló 1997). Esta situación es ligeramente diferente en las células epidérmicas y del xilema, donde la peroxidasa está localizada principalmente en las paredes celulares, tanto en las paredes celulares primarias (Goldberg y cols. 1987), fundamentalmente a nivel de las esquinas celulares y la lámina media, como en los engrosamientos secundarios (Ros Barceló 1995, Ros Barceló y cols. 2002); siendo las pectinas uno de los factores que contribuyen a la distribución específica de las diferentes isoenzimas de la peroxidasa en los diferentes dominios de la pared celular (Ros Barceló y cols. 1988b).

Estas particularidades también conciernen a la compartimentalización de las isoenzimas de la peroxidasa. De hecho, cabe resaltar que, mientras que el espectro completo de peroxidasas (ácidas y básicas) se localiza en las paredes celulares, en las vacuolas sólo hay peroxidasas fuertemente básicas (Pedreño y cols. 1993). Esto indica que en la biosíntesis y recambio de los metabolitos secundarios como los fenoles y los alcaloides, que se compartimentalizan principalmente en la vacuola, están implicadas sólo las peroxidasas básicas (Pedreño y cols. 1993, Ros Barceló y cols. 1997), mientras que en la biosíntesis de las ligninas y los entrecruzamientos de la extensina y de los grupos feruloilo de las pectinas (reacciones que tienen lugar en las paredes de la célula vegetal) están implicadas los dos tipos de peroxidasas.

### **III.5. Especificidad de sustrato**

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

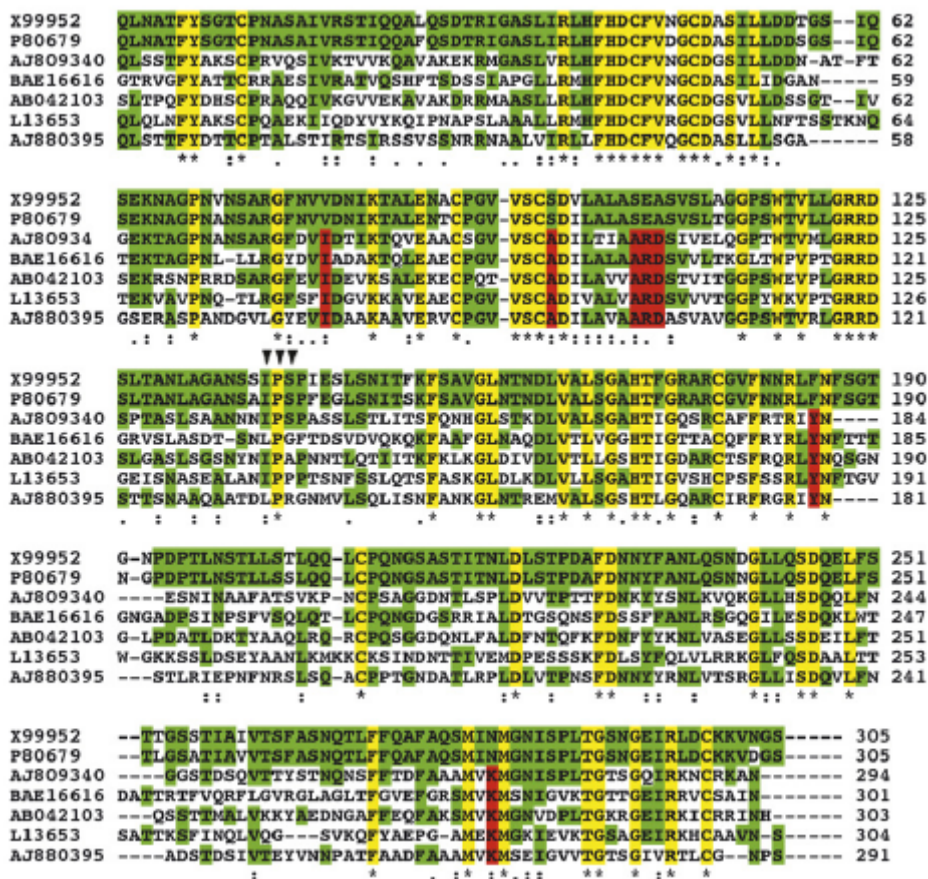
Tanto las peroxidasas ácidas como las básicas son capaces de oxidar a los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico. Sin embargo, este hecho no está tan claro en el caso del alcohol sinapílico, que no es sustrato de muchas peroxidasas ácidas (Ros Barceló y cols. 1987; Dean y Eriksson 1994, Tsutsumi y cols. 1994, Takahama 1995, Bernards y cols. 1999), aunque existen excepciones (Christensen y cols. 1998, Quiroga y cols. 2000). Esta observación es importante para revelar la especificidad y naturaleza de la enzima implicada en la biosíntesis de lignina, puesto que el alcohol sinapílico es más proclive a la oxidación que el alcohol coniferílico y el *p*-cumarílico (Kobayashi y cols. 2005). Estos resultados sugieren que, aunque las reacciones catalizadas por la peroxidasa están conducidas por fuerzas termodinámicas redox

(Ros Barceló y cols. 2004), la acomodación del sustrato en el centro catalítico de la enzima determina el papel real que juega cada isoenzima de la peroxidasa en la biosíntesis de ligninas. Así, se ha determinado, por estudios de cristalografía de rayos X, que la oxidación del alcohol sinapílico por ciertas peroxidases ácidas está dificultada estéricamente debido a interacciones hidrofóbicas desfavorables entre los átomos metoxi del alcohol sinapílico y los residuos conservados I-138 y P-139 en el sitio de unión al sustrato (Østergaard y cols. 2000) de la enzima.

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

Ros Barceló y cols. (2007) determinaron los determinantes estructurales de las peroxidases de tipo siringilo alineando la secuencia aminoacídica de peroxidases capaces de oxidar los residuos siringilo y de dos peroxidases guaiacilo típicas. Los alineamientos revelaron motivos estructurales diferenciales de las peroxidases de tipo siringilo, tales como V80, S98, 105-SEA, F185 y N281 (Figura 1.17). Estos motivos estructurales son necesarios y suficientes para determinar la actividad siringil-oxidasa de las peroxidases, como lo demuestra el hecho de que la peroxidasa PAPX5 de *Picea abies*, que es capaz de oxidar la siringaldazina (Marjamaa y cols. 2006a), muestra todos los motivos estructurales comunes a estas peroxidases.

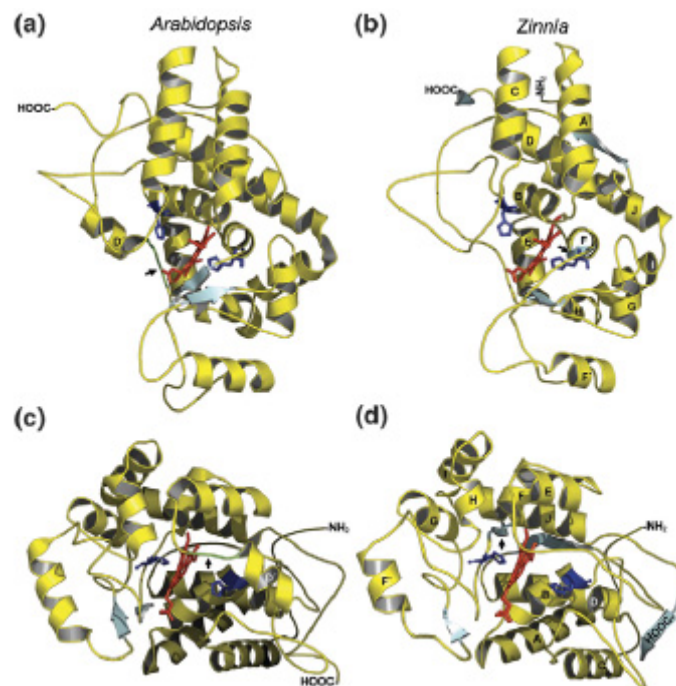
Un hecho importante es que los determinantes de las peroxidases de tipo siringilo se han conservado en la historia de las angiospermas, y también están presentes en Gnetales, Coniferales (que carecen de ligninas de tipo S) y en gimnospermas basales, que también carecen de ligninas de tipo S. Estos determinantes estructurales también se encontraron en plantas vasculares basales y hasta en plantas terrestres no vasculares como *Physcomitrella patens* y *Marchantia polymorpha*. Según estos datos, las peroxidases de tipo guaiacilo constituyen el estado más evolucionado de las peroxidases vegetales (Ros Barceló y cols. 2007).



**Figura 1.17.** Alineamientos estructurales de peroxidasas tipo siringilo y guaiacilo. Los motivos estructurales de las peroxidasas S (en rojo) se determinaron alineando la peroxidasa de *Z. elegans* (AJ880395) con las de tomate (L13653), espárrago (AB042103), álamo (BAE16616) y píceas (AJ809340) frente a dos peroxidasas G típicas, la ATP A2 (X99952) y HRP A2 (P80679). Los alineamientos muestran aminoácidos altamente conservados en todas las peroxidasas (en amarillo) y residuos aminoacídicos parcialmente conservados en ATP A2 y HRP A2 presentes en otras peroxidasas (en verde). Las cabezas de flecha señalan los aminoácidos I138, P139 y S140 que determinan la conformación e hidrofobicidad del sitio de unión al sustrato en la ATP A2. “\*” significa que los residuos aminoacídicos de la columna son idénticos en todas las secuencias del alineamiento. “.” significa que hay sustituciones conservadas. “-” significa que existen sustituciones semiconservadas. Tomado de Ros Barceló y cols. 2007.

Comparando la estructura tridimensional de una peroxidasa de tipo siringilo (*Zinnia elegans*) y otra de tipo guaiacilo (ATP A2 de *Arabidopsis thaliana*) se encontraron diferencias que podrían explicar la diferente especificidad de sustrato (Figura 1.18). La hélice D’ está ausente en las peroxidasas de tipo siringilo estudiadas (Gómez Ros y cols. 2007c). Esta observación puede constituir la piedra angular de la diferente especificidad de sustrato de las siringil-peroxidasas, ya que, en la ATP A2, la hélice D’ fija la posición del grupo prostético (Østergaard y cols. 2000). La ausencia de la hélice D’ en las siringil-peroxidasas probablemente representa un factor de relajación del centro catalítico, permitiendo el acceso de grupos siringilo. Además, la hélice D’ fija el motivo IPS en la ATP A2, que determina la conformación y la hidrofobicidad del sitio de unión al sustrato (Østergaard y cols. 2000).





**Figura 1.18.** Estructura tridimensional de la ATP A2 (a) y (c) y de *Z. elegans* (b) y (d). Las hélices  $\alpha$  están mostradas en amarillo. El motivo IPS aparece señalado en verde y con flechas en (a) y (c). Las láminas  $\beta$  aparecen en azul, mientras que las nuevas láminas  $\beta$  que aparecen en (b) y (d) se muestran con flechas. El grupo hemo se muestran en color rojo, mientras que las histidinas proximal y distal aparecen en azul. Tomado de Ros Barceló y cols. 2007.

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

### III.6. Papel fisiológico en la lignificación

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

Otro aspecto que deberían cumplir las enzimas que participasen en la polimerización de los alcoholes cinámicos es la de presentar una correlación cuantitativa con la lignificación. En el caso de las peroxidasas, esta correlación ha sido

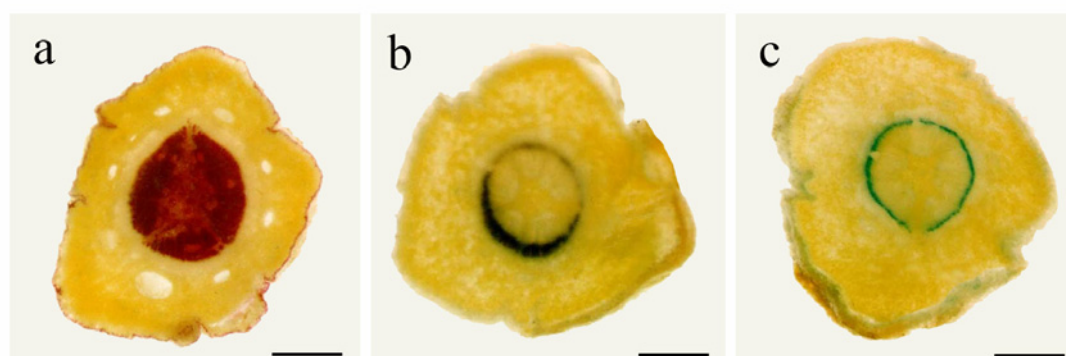
frecuentemente descrita en el endocarpo de melocotón (Abeles y Biles 1991), en fibras de lino (McDougall 1992), en álamo (Baier y cols. 1993), en agujas de píceas noruegas (Polle y cols. 1994) y en células en suspensión de *Zinnia* durante la diferenciación en traqueidas (Sato y cols. 1995a). Sin embargo, en ninguno de los casos anteriormente citados ha sido una sola peroxidasa, ya sea básica o ácida, la única implicada en esas correlaciones. De todos estos estudios se desprende la conclusión de que más de una isoenzima parece estar implicada en la polimerización de los alcoholes cinamílicos. Estos estudios podrían explicar por qué la reducción en la expresión de una isoenzima de peroxidasa individual no está acompañada por una reducción en la lignificación de la pared celular.

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

Las distintas isoenzimas de la peroxidasa pueden mostrar una cierta especificidad de sustrato y fuertes diferencias en su reactividad con los alcoholes cinamílicos. Cuando se estudian las afinidades de varias peroxidasas básicas aisladas de tejidos lignificantes por los alcoholes cinamílicos, se observan valores de  $k_M$  del orden de 10-400  $\mu\text{M}$  (Takahama 1993, Ros Barceló 1998b). Estos valores de  $k_M$ , mostrados por las peroxidasas, son menores que los mostrados por las lacasas vegetales (12 mM) (Bao y cols. 1993), y se encuentran dentro del orden (5-500  $\mu\text{M}$ ) de los valores de afinidad mostrados por las enzimas precedentes en la ruta biosintética (Grisebach 1981, Dharmawardhana y cols. 1995). En este punto, no se debe olvidar que los valores de  $k_M$  de las peroxidasas con respecto al alcohol coniferílico presentan una cierta dependencia de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , siendo proporcionalmente menor al descender la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ros Barceló 1998b). De hecho, los valores de  $k_M$  mostrados para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por muchas peroxidasas, cuando se usan concentraciones de alcohol coniferílico entre 30 y 160  $\mu\text{M}$  (Takahama 1993, Ros Barceló 1998b), sugieren que dichas enzimas se encuentran muy bien adaptadas a trabajar en presencia de bajas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Debido a la necesidad que tienen las peroxidasas del  $\text{H}_2\text{O}_2$  para su actuación, es lógico pensar que para que las peroxidasas tuvieran un papel activo en la lignificación de la pared celular, no sólo es indispensable que éstas se encuentren localizadas en las mismas áreas de la pared celular que lignifica, sino que también es necesario que, en ellas, las peroxidasas permanezcan activas (Figura 1.19). Por ello, es conveniente, aunque no indispensable (Ferrer y cols. 1990), que dichas áreas de la pared celular muestren una producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el fin de favorecer la actividad de las peroxidasas. En este sentido, se ha de mencionar el trabajo de Nose y cols. (1995), donde se ha descrito que agentes secuestradores del  $\text{H}_2\text{O}_2$  inhiben la lignificación de suspensiones celulares de *Pinus taeda*, datos que refuerzan la idea de que la síntesis de ligninas es totalmente dependiente de la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pudiendo tener éste,

en cierta medida, un papel regulador. El mayor dilema que persiste hoy día se refiere al mecanismo a través del cual se genera el  $H_2O_2$  necesario para activar a las peroxidasas durante la oxidación de los alcoholes cinamílicos. Diferentes estudios parecen apuntar la idea de que dicho sistema generador de  $H_2O_2$  estaría localizado a nivel de la membrana plasmática e implicaría a una NAD(P)H oxidasa que usaría NADPH citoplasmático (Ros Barceló 1998a, Ogawa y cols. 1997).



**Figura 1.19.** Secciones transversales de *Pinus halepensis* después de teñir con floroglucinol para revelar la presencia de ligninas (a), con KI-almidón para mostrar la localización del  $H_2O_2$  (b), y TMB, que indica la colocalización de la peroxidasa y el  $H_2O_2$  (c). Barras= 300  $\mu m$ . Tomado de Gómez Ros y cols. 2007c.

#### IV. Cultivos celulares

El cultivo celular es parte fundamental de la llamada “segunda revolución verde”, en la que se usan la biotecnología y la modificación genética para mejorar la calidad y la productividad de las cosechas (Collin y Edwards 1998). Los cultivos de células se inician primeramente con la formación de un callo. Un callo es una masa indiferenciada de células en crecimiento activo que, de forma natural, se origina a partir de tumores, heridas o por interacción del tejido con patógenos invasores. Los callos originados en cultivo *in vitro* se forman al depositar un fragmento seleccionado de tejido vegetal (explanto) en un medio de cultivo adecuado, de manera que sus células proliferan y comienzan a perder la estructura y organización tisular que mantenían en el tejido original (Thorpe 1980, Wagley y cols. 1987), mediante el proceso conocido como dediferenciación.

Las suspensiones celulares se obtienen mediante la transferencia de una porción de callo friable a un medio de cultivo líquido (Rashid 1988). Estas suspensiones celulares deben estar en agitación, para garantizar un aporte equitativo de los nutrientes y del oxígeno a todas las células en suspensión.

Las perspectivas y uso de los métodos de propagación *in vitro* de células y tejidos vegetales, se han centrado hasta ahora en la micropropagación acelerada de material vegetal (Pati y cols. 2006), el mantenimiento de bancos de germoplasma

(Wang y Perl 2006), la producción de metabolitos secundarios (Cusidó y cols. 2002, Vanisree y cols. 2004), la biotransformación de compuestos orgánicos (Moyano y cols. 2007), la embriogénesis somática (Steinmacher y cols. 2007) y la producción de proteínas recombinantes (Hellwing y cols. 2004).

#### **IV.1. Uso de cultivos celulares como herramienta de investigación**

Los cultivos celulares, tanto en callos como particularmente en suspensiones celulares, presentan numerosas ventajas frente al uso de plantas intactas, como son el control del ambiente físico y químico, la obtención de muchos individuos a partir de un material limitado, o la obtención de células genética y fisiológicamente uniformes (Collin y Edwards 1998, Lee y cols. 2005). A pesar de estas ventajas, el conocimiento de la respuesta de un órgano vegetal en concreto no es posible. Por otro lado, el medio extracelular en el que crecen cultivos celulares vegetales puede considerarse como un amplio espacio intercelular que forma una continuidad con la pared de la célula vegetal (van Huystee y Tam 1988).

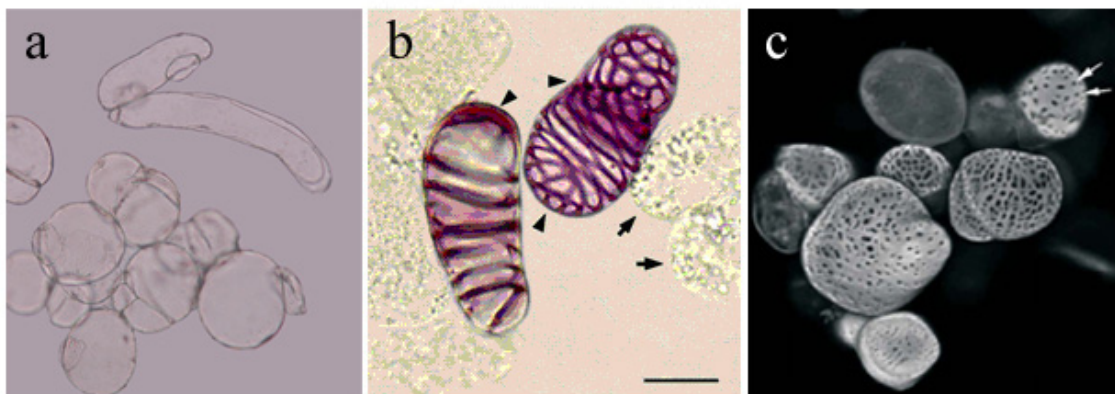
Debido a que las células excretan muchos productos al medio extracelular, éstos se pueden recuperar de las suspensiones celulares con métodos no destructivos. Esta es una de las razones por las que las suspensiones de células vegetales son herramientas útiles en la investigación rutinaria. Además, las células en suspensión están todas en contacto con el medio que les rodea. Al carecer, en su mayoría, de pared secundaria y al no formar tejidos es más fácil extraer los compuestos intracelulares. Esto las hace especialmente útiles para estudios de estrés ambiental, tanto biótico (Honée y cols. 1998, Egea y cols. 2001) como abiótico (Zhao y cols. 2004, Kim y cols. 2007b); estudios de expresión génica (Kjæråsård y cols. 1997, Sato y cols. 1997); proteómicos (Imin y cols. 2004, Lei y cols. 2005) o para conocer mejor la ruta de biosíntesis de ligninas (Anterola y cols. 2002).

Los cultivos celulares son también útiles para el estudio de las peroxidasas, especialmente las suspensiones celulares. En cuanto a estas últimas, las peroxidasas ligadas iónicamente a la pared pueden ser liberadas al medio y pueden separarse de las peroxidasas de células intactas. Mediante centrifugación o filtración se puede aislar el medio de cultivo de forma no plasmolizante y la contaminación con enzimas intracelulares es mínima (Bruce y West 1989). Por ello son una fuente adecuada para determinados tipos de estudios, como la obtención de peroxidasas implicadas en el metabolismo de la pared celular (Schnabelrauch y cols. 1996, Melo y cols. 1997, de Marco y cols. 1999) o para purificar peroxidasas extracelulares, como atestiguan Dean y cols. (1994) en *Acer pseudoplatanus*, Brownleader y cols. (1995) en tomate, Østergaard y cols. en *Arabidopsis* (1996), Narita y cols. (1995) en tabaco o Gabaldón y cols. (2005) en *Zinnia*.

## IV.2. Lignificación en cultivos celulares

Aunque la presencia de ligninas en las plantas terrestres, se asocia con la adquisición de la estructura vascular, ciertos briófitos como *Marchantia polymorpha* (Españeira 2007, comunicación personal), que carecen de tejidos vasculares, presentan células capaces de lignificar.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que existen células vegetales ajenas al xilema que muestran lignificación, no es sorprendente que también lo hagan los cultivos celulares, a pesar de tratarse de células indiferenciadas. De hecho, estos cultivos celulares se originan del cambium vascular, tejido madre del floema y del xilema, por lo que la capacidad de lignificar se encuentra latente en ellos. Además, su uso como herramienta de trabajo presentaría ventajas sobre las plantas intactas. Una de las dificultades al descifrar los procesos que acompañan la maduración de la pared celular y la lignificación en las plantas es que las células difieren de manera muy marcada en el desarrollo de la pared (grosor, composición de los polímeros, etc). Por ejemplo, tanto el contenido en lignina como la composición monomérica varían de forma gradual desde el interior del cambium hacia el xilema totalmente diferenciado (Higuchi 1980). En principio, debería ser posible obtener cultivos celulares en estados específicos de maduración de la pared, en donde la lignificación se desarrollaría de manera más o menos sincrónica.



**Figura 1.20.** Comparación de cultivos celulares que sólo desarrollan pared primaria y otros con formación inducida de pared secundaria. Células en suspensión sin pared secundaria de *Ginkgo biloba* vistas a 100X (a), células de *Zinnia elegans* teñidas con floroglucinol-HCl mostrando las células del mesófilo (flechas) y las células diferenciadas a traqueidas (puntas de flecha); barra= 20  $\mu$ m, tomado de Gómez-Ros y cols. 2006 (b), y microfotografía confocal de los elementos traqueales diferenciados de callos de *Pinus radiata*, mostrando con flechas blancas los engrosamientos de la pared secundaria; tomado de Möller y cols. 2005 (c).

La mayor parte de las células en suspensión sólo tienen pared primaria, pero se han conseguido obtener células con una pared secundaria diferenciada en *Zinnia*, tabaco, *Pinus radiata* o álamo (Fukuda y Komamine 1980, Blee y cols. 2001a, Möller y cols. 2003, Ohlsson y cols. 2006) (Figura 1.20). En estos últimos casos, la obtención de elementos diferenciados del xilema se consiguió con la combinación adecuada de hormonas, manipulación genética, o adición de carbón activo al medio de cultivo.

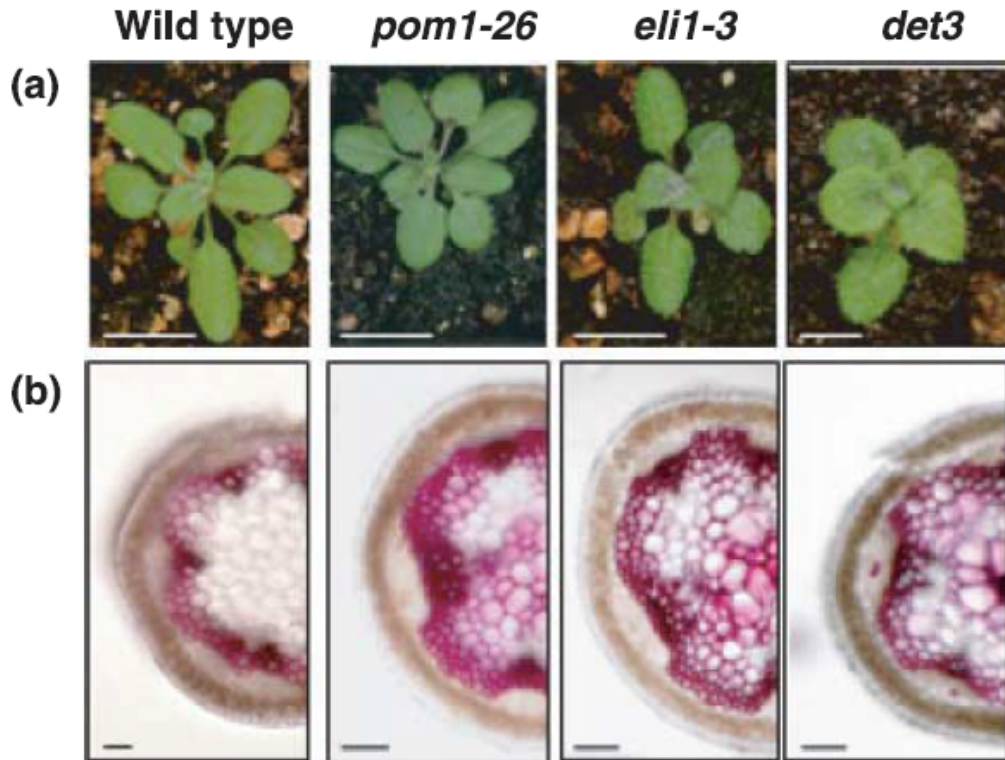
De todos modos, aunque no es necesario inducir elementos del xilema para estudiar los procesos de lignificación, la mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo con suspensiones celulares o callos en los que la presencia de pared celular secundaria se ha inducido por medio de hormonas, azúcares u otros compuestos añadidos al medio de cultivo (Eberhardt y cols. 1993, Anterola y cols. 2002). En suspensiones de *Picea abies* se ha conseguido inducir síntesis de lignina extracelular como respuesta a algún tipo de estrés, muy semejante a la lignina de la madera o de suspensiones sin elicitar. Para ello se usó elicitor de un patógeno de picea (Messner y Boll 1993, Lange y cols. 1995) o se cambió la composición del medio de cultivo (Brunow y cols. 1990, Kärkönen y cols. 2002). También se ha conseguido lignina extracelular en suspensiones de *Pinus taeda*, añadiendo glucosa al medio de cultivo (Nose y cols. 1995). Sin embargo, en pocas ocasiones se ha estudiado la composición de las ligninas en cultivos celulares en los que su formación no haya sido inducida (Christiernin y cols. 2005, Gabaldón y cols. 2006, Hano y cols. 2006).

Hallazgos recientes acerca del último paso de la síntesis de ligninas (acoplamiento oxidativo de monolignoles) en suspensiones celulares de *Zinnia elegans* han demostrado que la tasa de aportación de los tres radicales de los monolignoles es proporcional a sus potenciales de óxido-reducción, implicando que estas reacciones se llevan a cabo exclusivamente mediante fuerzas termodinámicas redox (Gabaldón y cols. 2006). Experimentos en *Z. elegans* (una angiosperma) han corroborado observaciones previas hechas en suspensiones celulares de *Pinus taeda* (una gimnosperma) (Nose y cols. 1995) y han demostrado que la lignificación de las paredes en suspensiones celulares, tal y como ocurre en el xilema, sólo está controlada por la tasa de aportación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos con suspensiones celulares de *Z. elegans* también muestran que los sitios para el entrecruzamiento de los monolignoles mediante enlaces β-O-4 en paredes celulares primarias podrían saturarse (Gabaldón y cols. 2006), sugiriendo que el crecimiento lineal de la macromolécula de lignina no es infinito.

### IV.3. Lignificación ectópica

Como se ha descrito anteriormente, existen evidencias que sugieren que la biosíntesis de ligninas está regulada a nivel transcripcional (Peter y Neale 2004). Dicha regulación se ha estudiado mediante análisis de los promotores. Varios genes de la ruta fenilpropanoide se han clonado y se ha analizado las actividades de sus promotores (Raes y cols. 2003). Mediante análisis de delección en los promotores de estos genes se identificaron elementos *cis* denominados elementos AC, que son críticos para la expresión específica en un tejido (Peter y Neale 2004). Estos elementos AC son similares a los motivos de ADN reconocidos por los factores de transcripción MYB. Las proteínas MYB son capaces de unirse a los elementos AC (Sablowski y cols. 1994)

La lignina se acumula en un número limitado de tipos celulares durante el desarrollo normal de la planta; con la excepción de las células del xilema, las paredes celulares primarias de los tejidos de las traqueófitas no lignifican (Ros Barceló 1997). Sin embargo, existen mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la distribución espacial de las ligninas, depositándose en otros tipos celulares diferentes, hecho que se denomina lignificación ectópica (Figura 1.21).



**Figura 1.21.** Comparación fenotípica de mutantes con lignificación ectópica y plantas salvajes de *Arabidopsis* en las rosetas (a). Secciones teñidas con floroglucinol-HCl de los tallos de inflorescencias (b). Barra 1 cm (a) o 100  $\mu$ m (b). Tomado de Rogers y cols. 2005.

El mutante *eli1* (ectopic lignification) muestra un anormal número de células que se diferencian en traqueidas, pero que no pueden formar filas de células. Estas traqueidas tienen engrosamientos de la pared celular pero no pueden formar placas perforadas. También se encontró lignificación en células de la corteza y del endodermo (Cano-Delgado y cols. 2000).

El mutante *det3* (de-etiolated) muestra enanismo que se explica por una reducción de la expansión celular (Cabrera y Poch y cols. 1993). El gen que causa la mutación codifica para la subunidad C de una ATPasa de tipo vacuolar (Schumacher y cols. 1999). Este mutante presenta lignificación ectópica en la médula, cuya lignina es rica en grupos siringilo (Rogers y cols. 2005).

El mutante *elp1* (ectopic lignification in the pith) tiene un fenotipo característico de los mutantes que muestran lignificación ectópica, con deposiciones de lignina en las paredes celulares primarias de las células del parénquima además de su

deposición normal en las paredes celulares secundarias del xilema y de las fibras (Zhong y cols. 2000). Estas ligninas son ricas en unidades siringilo, asemejándose a las ligninas presentes en las fibras interfasciculares. Estos mutantes tienen más cantidad de ligninas que el genotipo salvaje y las actividades de varias enzimas de la ruta de biosíntesis de las ligninas son mucho mayores que en las plantas control. Se cree que la proteína codificada por el gen causante de la mutación crea una señal endógena que es importante para el crecimiento normal y el desarrollo de la planta (Zhong y cols. 2002).

El fenotipo de la lignificación ectópica podría atribuirse a un error en la regulación de los genes de la biosíntesis de ligninas, y este error podría implicar reguladores comunes o distintos en los mutantes estudiados (Rogers y cols. 2005).

Se ha visto una relación entre la lignificación ectópica y la actividad R3R3-MYB (Patzlaff y cols. 2003, Newman y cols. 2004, Rogers y cols. 2005). *AtMYB61*, un miembro de la familia R2R3-MYB se expresa menos en el mutante *det3* (Newman y cols. 2004). La expresión de *AtMYB61* está restringida a las células de los tejidos vasculares en las plantas salvajes, pero en el mutante *det3* se observaba un patrón de lignificación ectópica semejante al típico de dicho mutante. La sobreexpresión de *AtMYB61* en plantas salvajes producía una fenocopia del mutante, incluyendo la acumulación ectópica de lignina. La supresión de *AtMYB61* en el mutante conducía al fenotipo típico del mutante (Newman y cols. 2004).

Además del control por activadores de la expresión génica, también podría existir una inactivación de represores de la expresión de genes de la biosíntesis de lignina. Estos genes podrían codificar represores de la deposición de lignina y, cuando están reprimidos, permitir la expresión de los genes de biosíntesis de ligninas. De hecho, *AtMYB4* es un conocido represor de algunos de los genes implicados en la biosíntesis de ligninas (Jin y cols. 2000) y la cantidad de sus transcritos disminuye bajo condiciones que resultan en un incremento de la deposición de ligninas (Rogers y cols. 2005).

Estos resultados sugieren que el locus *ELP1* está aparentemente implicado en la represión de la ruta de biosíntesis de las ligninas en la médula, de forma similar a como podría estar ocurriendo en otros tejidos que no lignifican. La deposición ectópica de lignina en las células de la médula en el mutante *elp1* tiene dos características: i) no es dependiente de la edad, ya que las ligninas se observan no sólo en la médula de los tallos viejos, sino también en la médula de tallos jóvenes en proceso de elongación (Zhong y cols. 2000) y ii) es independiente del desarrollo de los engrosamientos de la pared secundaria (Zhong y cols. 2000). En ambos aspectos, la deposición ectópica de ligninas en las células de la médula del mutante *elp1* se asemeja al proceso de lignificación que ocurre en cultivos celulares, que son capaces de lignificar, aún careciendo de paredes celulares gruesas (Eberhardt y cols. 1993, Kärkönen y cols. 2002, Christiernin y cols. 2005, Gabaldón y cols. 2006, Koutaniemi y cols. 2007). La competencia adquirida de las suspensiones celulares para lignificar



encaja bien con el hecho de que los cultivos celulares derivan de las células del cambium, que también origina los tejidos vasculares de los brotes, incluyendo el xilema.

En esta tesis, se muestra que las suspensiones celulares de los dos principales linajes de plantas (angiospermas y gimnospermas) no presentan alteraciones predecibles en la cantidad ni en la cualidad de las ligninas al compararlas con sus respectivos tejidos parentales, observación que hace necesario revisar la visión actualmente aceptada de la evolución de la lignina, y la ganancia evolutiva del segmento de la ruta que lleva a la biosíntesis de los grupos siringilo. También se muestra, mediante análisis del proteoma de las suspensiones celulares, que éstas ofrecen una oportunidad única para cubrir el mecanismo que regula la deposición de lignina, especialmente la enzimología del último paso que controla la generación y el ensamblaje de los radicales fenoxilo.



*Objetivos*



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

i) la caracterización del crecimiento de callos de *Betula pendula* y *Ginkgo biloba*, así como la caracterización de la actividad peroxidasa frente a distintos sustratos, a través del uso de inhibidores y el estudio del patrón de isoenzimas

ii) el establecimiento y caracterización del crecimiento de suspensiones celulares de *Betula pendula* y *Ginkgo biloba*, junto con el estudio de la actividad peroxidasa presente en el medio extracelular y de su patrón isoenzimático

iii) el estudio comparativo de la lignificación en plantas y suspensiones celulares de *Betula pendula*, *Ginkgo biloba* y *Cycas revoluta*, con especial énfasis en la naturaleza y composición monomérica de las ligninas

iv) el estudio del proteoma extracelular de *Betula pendula*, *Ginkgo biloba* y *Cycas revoluta*, con el fin de determinar el grado de conservación de las proteínas de la pared celular que participan en su metabolismo, y

v) la purificación y caracterización molecular de las peroxidasas presentes en el proteoma extracelular de *Betula pendula*, *Ginkgo biloba* y *Cycas revoluta*. Finalmente, se compararán sus propiedades con las propiedades de la peroxidasa de *Z. elegans*, una de las plantas más evolucionadas dentro del grupo de las plantas con semillas.



*Material y métodos*





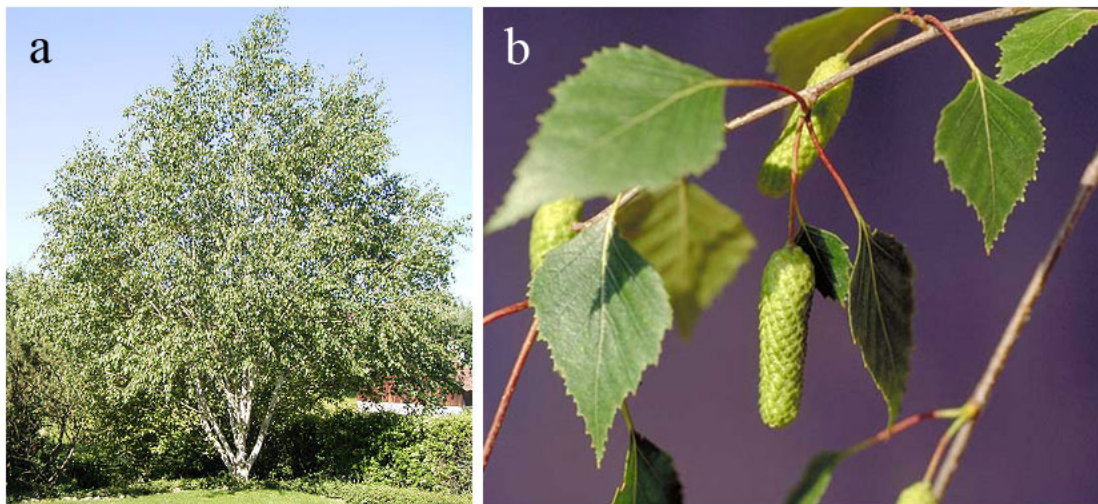
## I. Material vegetal

### I.1. Especies vegetales

#### *Betula*

La especie *Betula pendula* Roth (sin. *B. verrucosa* Ehrh) (Figura 2.1) se conoce comúnmente como abedul, perteneciente a la familia *Betulaceae*. Se trata ésta de una familia monofilética con seis géneros actuales y 130 especies. Se cree que esta familia se originó en el periodo Cretácico superior hace 70 millones de años, en el centro de China y que tuvo su periodo de diversificación en el Oligoceno, hecho apoyado por el registro fósil desde hace 20 millones de años (Chen y cols. 1999).

*B. pendula* es un árbol caducifolio de corteza blanca, ramas colgantes y hojas romboides. Es una especie monoica, con las flores masculinas y femeninas en amentos amarillos o verdes. Es autóctona originaria de casi toda Europa, oeste de Siberia, este de Asia y Norte de Marruecos. Tiene numerosas aplicaciones, como árbol ornamental, alimento, cosmética y como fuente de su apreciada madera.



**Figura 2.1.** *B. pendula* (a) y detalle de las hojas e inflorescencia (b).

#### *Ginkgo*

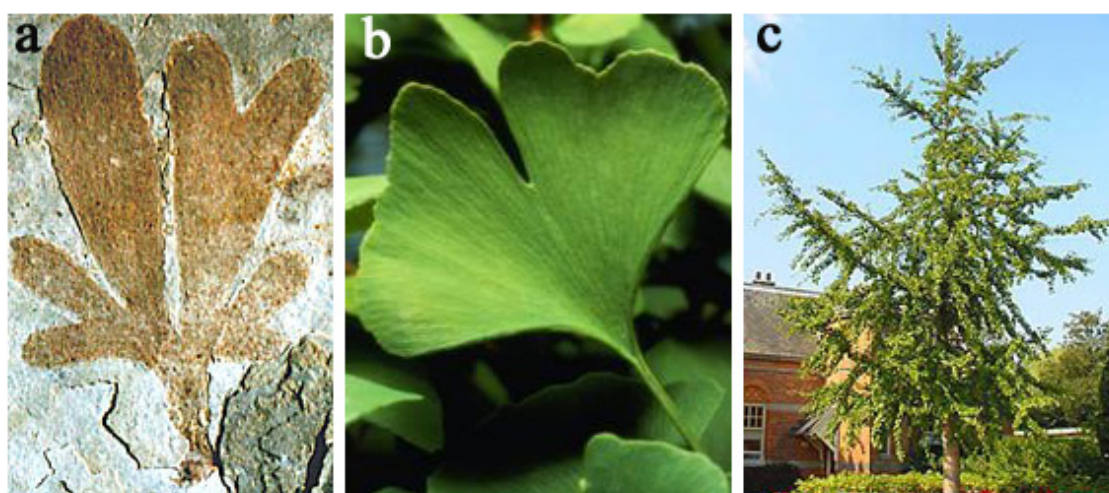
*Ginkgo biloba* L. (Figura 2.2), comúnmente conocido como *el árbol del cabello de Venus*, es un árbol dioico y caducifolio de hojas típicas bilobadas, de la familia *Ginkgoaceae*. En su reproducción permanecen caracteres arcaicos, con un tipo de fecundación simple que comparte con las Cycadales, con las que compone el conjunto de las pre-espermatófitas.

Es conocido como “fósil viviente”, puesto que tuvo gran importancia durante el Mesozoico, pero hoy en día es exclusivo de Japón y del este y sur de China. Los fósiles más antiguos datan del Pérmico superior (hace 260 -250 millones de años). Las hojas fósiles y los órganos vegetativos muestran que en ese tiempo había al menos dos especies. Durante el Jurásico medio hubo un gran incremento en especies (5 o 6), con una diversidad máxima (al menos 11 especies) durante el periodo Cretácico (hace

144 millones de años) en Asia, Europa y Norte América. Fue común y estuvo diseminado durante un largo periodo de tiempo, pero debido a cataclismos geológicos tan solo quedó una especie (*G. adiantoides*) en el terciario (hace 65 millones de años), que es notablemente similar a *G. biloba* (Zhou y Zheng 2003). En la actualidad se encuentra en la lista roja de especies en riesgo de extinción (IUCN 2007).

La mayor parte de las investigaciones realizadas con esta especie han estado orientadas al conocimiento de sus extensos efectos terapéuticos: cardiovasculares, neurológicos y metabólicos (Rodríguez y cols. 2007, Kim y cols. 2007a, Boveris y cols. 2007).

Sin embargo, existe una notable ausencia de estudios sobre las peroxidases en esta planta, a pesar de tratarse de una gimnosperma primitiva con tejidos vasculares lignificados. Precisamente por esta última razón, el otro uso de esta planta en la investigación se refiere a estudios de filogenia, al ser éste el único ejemplar del orden Ginkgotales. No obstante, los trabajos realizados se limitan a usar plantas intactas. Es notable la escasez de estudios con cultivos celulares. A principios de los años 80 se llevó a cabo un programa de biotecnología para mejorar la biosíntesis, en la planta intacta y en cultivos celulares, de sustancias activas terapéuticamente, principalmente terpenos como los ginkgolíidos (Sohier 2002).



**Figura 2.2.** Fósil de *Ginkgo apodes*, encontrado en la formación de Yixian (China) y perteneciente al periodo cretácico temprano (121 m.a.) (a). Detalle de una hoja de *G. biloba* (b). Aspecto general del árbol (c).

### *Cycas*

La especie *Cycas revoluta* Thun. (Figura 2.3), también denominada *Palma de Sagú*, pertenece a la familia *Cycadaceae*, cuyos miembros tienen aspecto de palmeras pero que son gimnospermas. Esta familia constituye una reliquia del pasado y representa antiguas plantas con semilla vivientes, probablemente descendientes vivos de las Pteridospermas, o “helechos con semilla”, las plantas con semilla más primitivas. Los fósiles de Cycadas más antiguos datan del Paleozoico Superior (hace aproximadamente 265-290 millones de años) (Brenner y cols. 2003), aunque las Cycadas ya existían durante el período del Carbonífero superior al Pérmico (hace

aproximadamente 300 millones de años). Llegaron a dominar durante el Mesozoico, pero en la actualidad están restringidas a zonas de clima templado. Con algunas excepciones, la mayoría de las filogenias (Qiu y cols. 1999, Pryer y cols. 2002) sitúan a las Cycadales como el orden basal de las gimnospermas, con los Ginkgotales (*Ginkgo biloba*) y los Coniferales como órdenes más avanzados. Esta ubicación define a las Cycadas como el grupo hermano de todas las plantas vivientes con semilla.

Su posición filogenética las hace objeto de numerosos estudios sobre evolución vegetal, aunque últimamente se ha ampliado su estudio al campo de la medicina, ya que se han ligado algunos de sus compuestos secundarios a desórdenes neurológicos como la “demencia de Guam” que sufren aquellos que ingieren *Cycas* (Norstog y Nicholls 1997, Sacks 1997).



**Figura 2.3.** *C. revoluta* (a). Detalle de conos masculinos (b).

## I.2. Condiciones de recogida de las especies vegetales

Se recogieron los ápices de ramas jóvenes de *B. pendula* en Julio de 2006 en el campus de A Zapateira en la localidad de A Coruña. Los ápices de las ramas de *G. biloba* se recogieron en la misma época que *B. pendula* en la localidad de Sada (A Coruña). *C. revoluta* se compró en un vivero (Viveros Murcia). Las semillas de esta gimnosperma se recogieron directamente de la planta madre.

## I.3. Callos

### I.3.1. Obtención y mantenimiento de callos

Los callos de *Betula pendula* y *Ginkgo biloba* fueron suministrados por la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

Los callos se mantuvieron en una cámara de cultivo a 24°C y en oscuridad o con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad para los ensayos que así lo requerían. Para el mantenimiento de los callos de *B. pendula* se usó el medio LS (Tabla 2.1), modificado de Murashige y Skoog (1962). En el caso de *G. biloba* el

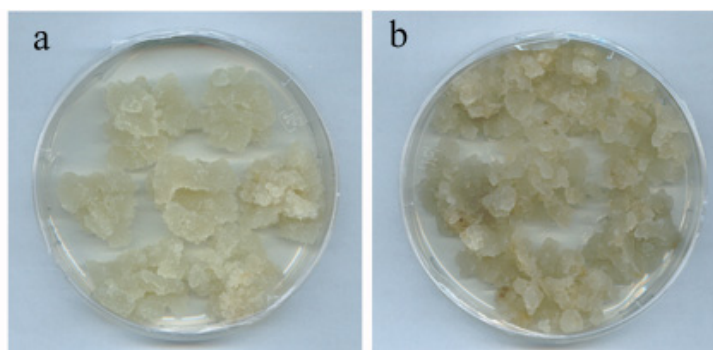
medio utilizado fue el 4X, medio modificado de Gamborg y cols. (1968), cuya composición se muestra en la Tabla 2.2. Los callos se subcultivaron aproximadamente cada 21 días.

**Tabla 2.1.** Composición del medio LS utilizado para el cultivo de *B. pendula*.

<b>Constituyente</b>	<b>Concentración (mg/l)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,65
KNO <sub>3</sub>	1,9
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,37
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17
CaCl <sub>2</sub>	0,332
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	16,75
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10,6
KI	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub>	0,016
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Fuente de hierro</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	0,041
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,027
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina / HCl	0,4
Mio – Inositol	100
<b>Hormonas</b>	
2, 4 D	0,22
1 ANA	0,186
<b>Fuente de carbono</b>	
Sacarosa	30000
Agar	8000
pH	6,0

Tabla 2.2. Composición del medio 4X utilizado para el cultivo de *G. biloba*.

<b>Constituyente</b>	<b>Concentración (mg/l)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150
KNO <sub>3</sub>	2500
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	250
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	133
CaCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	186
<b>Micronutrientes</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3
KI	0,75
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub>	0,16
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,25
<b>Fuente de hierro</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	34,25
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	25,57
<b>Vitaminas</b>	
Ácido Nicotínico	1
Tiamina / HCl	10
Piridoxina / HCl	1
Mio – Inositol	100
<b>Hormonas</b>	
2, 4 D	2,0
1 ANA	0,5
3 AIA	0,5
Kinetina	0,2
<b>Fuente de carbono</b>	
Sacarosa	20000
<b>Fuente de nitrógeno orgánico</b>	
Caseína	2000
Agar	8000
pH	5,6

Figura 2.4. Callos de *G. biloba* (a) y *B. pendula* (b), a los 21 días del subcultivo.

El cultivo *in vitro* de *C. revoluta* se inició a partir de las semillas de la planta *in vivo*. Para ello, se eliminó la sarcotesta (Figura 2.5) de las semillas con un martillo, ya que es muy rígida y dificultaría el trabajo posterior en condiciones asépticas. Posteriormente, las semillas se lavaron con agua abundante y se secaron. A continuación, se sometieron a un proceso de esterilización, primero en etanol al 70 % durante un minuto y, segundo en hipoclorito cálcico al 7 % con Tween-20 al 0,1% durante 20 minutos. Después las semillas se aclararon tres veces con agua estéril. Con ayuda de unas pinzas y un bisturí se localizó el embrión que se transfirió, junto con los tejidos circundantes, a medio D1 (Tabla 2.3) para inducir callos. El material vegetal procesado se mantuvo en oscuridad y a 24°C.



Figura 2.5. Macrosporófilo de *Cycas revoluta* (a), y semillas mostrando la sarcotesta roja (b).

Tabla 2.3. Composición del medio D1 utilizado para el cultivo de *C. revoluta*.

Constituyente	Concentración (mg/l)
<b>Macronutrientes y micronutrientes</b>	
Sales basales MS 0153	2200
<b>Vitaminas</b>	
Pantotenato cálcico	1
Mio-Inositol	100
Biotina	0,01
Ácido nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina	1500
Vitamina B <sub>3</sub>	1000
<b>Hormonas</b>	
1 ANA	1,1
BA	0,225
<b>Fuente de carbono</b>	
Sacarosa	30000
<b>Fuente de nitrógeno orgánico</b>	
Caseína	250
Agar	7500
pH	6,0

### **I.3.2. Caracterización del crecimiento de callos**

Se colocaron 2 g de porciones de callo de *B. pendula* y *G. biloba* en placas con medio fresco. Un grupo de placas se mantuvo en oscuridad total, y otro con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad; ambos a 25°C. A los 7, 14, 21 y 28 días se recogió todo el callo que había crecido en las placas y se pesó, determinándose así su peso fresco (PF). A continuación, este material se mantuvo a 80°C durante dos días con el fin de obtener el peso seco (PS).

### **I.4. Suspensiones celulares**

Los callos son una fuente más accesible de células que la planta intacta, pero el tejido no es uniforme, ya que sólo la base del callo está en contacto con el medio y puede haber células en diferentes estados de desarrollo. La alternativa es el uso de suspensiones celulares.

#### **I.4.1. Obtención de suspensiones celulares**

Se iniciaron suspensiones celulares a partir de callos friables de 21 días, transfiriendo 20 g de callo a matraces de 250 ml de capacidad, que contenían 80 ml de medio líquido idéntico al descrito para el mantenimiento de los callos, pero sin agar. Se mantuvieron a 24°C en agitación (130 rpm) y en oscuridad. Las suspensiones celulares se subcultivaron cuando éstas alcanzaban el estado estacionario.

#### **I.4.2. Caracterización del crecimiento de suspensiones celulares**

Para caracterizar el crecimiento de las suspensiones celulares, se midieron en distintas fases del crecimiento celular tres parámetros: volumen de empaquetamiento celular (PCV), conductividad y pH, determinándose a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 días de iniciadas las suspensiones celulares de *B. pendula*, y a los 0, 7, 14, 21 y 28 días en el caso de *G. biloba*.

El PCV es una variable indicativa de la tasa de división celular que permite identificar y diferenciar la fase logarítmica de crecimiento y la fase estacionaria. Otro método para medir el crecimiento de las suspensiones celulares es el recuento de células al microscopio. Sin embargo, a menudo no es posible separar las células de los agregados celulares de las suspensiones de forma adecuada, haciendo la técnica difícil de usar. La conductividad da una idea del consumo de nutrientes de las células. Una disminución de la conductividad se asocia a un descenso en la concentración de sales (nutrientes) en el medio. La variación del pH da una idea de la posible acidificación/alcalinización del medio debida a la producción de metabolitos por parte de las células en suspensión.

#### *Determinación del Volumen de Empaquetamiento Celular (PCV)*

Para determinar el PCV se tomaron alícuotas de 4 ml de las suspensiones celulares, que se centrifugaron en una centrífuga refrigerada de rotor basculante Eppendorf a 1000xg durante 5 minutos, y se determinó la proporción de volumen celular respecto del volumen total de la suspensión celular, considerando el valor obtenido como PCV. En el momento de establecer el PCV se separaron, con ayuda de una pipeta Pasteur, el sobrenadante, considerándose como medio extracelular y el precipitado, tomándolo como masa celular. Se cuantificó el volumen del medio extracelular obtenido, se dializó toda la noche frente tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y se congeló a -80°C para su posterior uso, después de haber determinado su conductividad y pH.

#### *Determinación de la conductividad (Con)*

La conductividad eléctrica se midió con un conductímetro Crison CM35, que proporciona además una medida de la salinidad. Los resultados se expresan en mS/cm.

#### *Determinación del pH*

La determinación del pH se efectuó mediante un pH-metro Crison micropH 2001.

## **II. Determinación de la actividad peroxidasa**

### **II.1. Fraccionamiento subcelular de la peroxidasa en callos**

Para caracterizar la actividad peroxidasa, en el caso de los callos de *B. pendula* y *G. biloba*, se tomaron muestras a los 7, 14, 21 y 28 días. Se usaron callos mantenidos tanto a la oscuridad como a la luz. De cada placa petri se cogieron 2 g de tejido que se congeló inmediatamente a -80°C para su posterior uso.

Se homogeneizaron 2 g de callo en un mortero con arena en una proporción 1:2 (p/v) en un tampón de extracción compuesto por sacarosa 0,25 M, (AcO)<sub>2</sub>Mg 1 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7,5. En el momento de la homogeneización se le añadió al tampón PVPP 0,1 g/ml. La homogeneización se realizó a 4°C.

El homogeneizado se filtró a través de dos gasas, previamente enfriadas, descartándose el material retenido. El eluido de la filtración se centrifugó durante 15 minutos a 1000xg en una centrífuga refrigerada Eppendorf. El precipitado de esta centrifugación se consideró como fracción primaria de paredes, y el sobrenadante se sometió a una última centrifugación a 27000xg durante 20 minutos en una centrífuga Beckman J2-21, considerándose este precipitado como fracción de membranas y el sobrenadante como fracción soluble.

La solubilización de la actividad peroxidasa enlazada a membranas se realizó de acuerdo con la técnica desarrollada por Ros Barceló y cols. (1988a). Para solubilizar la enzima iónicamente enlazada a la fracción de membranas, se incubaron éstas con KCl



1 M durante 30 minutos, centrifugándose a continuación a 27000xg durante 20 minutos en una centrifuga Beckman J2-21. Se consideró al sobrenadante obtenido como fracción de peroxidasas iónicamente ligadas a membrana.

El proceso de extracción de la enzima ligada a paredes celulares, se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Ros Barceló y cols. (1987). Para ello, la fracción primaria de paredes celulares se resuspendió con Tritón X-100 al 1% y n-octanol al 0,2% en tampón Tris-HCl 5 mM pH 7,5 y a continuación, se centrifugó a 1000xg durante 10 minutos. El nuevo precipitado se lavó con el mismo tampón para eliminar restos membranosos y, una vez centrifugado, se volvió a lavar en dos ocasiones con tampón Tris-HCl 50 mM, centrifugándose, después de cada lavado, en las mismas condiciones. El precipitado obtenido al finalizar los lavados se consideró fracción ligada a paredes celulares.

Para solubilizar la enzima iónicamente ligada a la fracción de paredes celulares, se incubó la fracción con KCl 1 M durante 30 minutos, centrifugándose a continuación a 1000xg durante 10 minutos, y considerándose al sobrenadante de esta centrifugación como fracción de peroxidasas iónicamente enlazadas a la pared celular. Todas las fracciones obtenidas durante los anteriores procesos de extracción se dializaron durante toda la noche en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

## **II.2. Obtención de la proteína extracelular de suspensiones celulares**

Para obtener la proteína extracelular, soluble en el medio de cultivo, se tomaron alícuotas a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 para *B. pendula*, y a los 0, 7, 14, 21 y 28 días en el caso de *G. biloba*. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1000xg, y el sobrenadante se consideró como medio extracelular, donde se hallan las proteínas solubles extracelulares. Finalmente, el medio extracelular se dializó toda la noche frente a tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

## **II.3. Obtención de la proteína del apoplasto de ápices**

Para ello, los ápices de las ramas de *B. pendula* se cortaron en secciones de 5 mm, y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se sometieron a infiltración a vacío durante un periodo de 5 minutos de 1,0 KPa, y a 4°C, en tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0, que contenía KCl 1 M y CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Una vez realizada la infiltración, se escurrieron las secciones y a continuación se centrifugaron en una jeringa dentro de un tubo de centrifuga a 1000xg durante 5 minutos a 4°C. La fracción proteica obtenida se dializó toda la noche frente a tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

## **II.4. Medidas de la actividad peroxidasa**

La actividad peroxidasa de las distintas muestras se determinó a 25°C, en los espectrofotómetros Cary 3E y Uvikon 923, usando un medio de reacción compuesto por tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM, y distintos donadores de

electrones: 4-metoxi- $\alpha$ -naftol 1 mM ( $\epsilon_{595} = 21,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), tetrametilbenzidina-HCl 0,1 mg ml<sup>-1</sup> ( $\epsilon_{652} = 39,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), siringaldazina 50  $\mu\text{M}$  ( $\epsilon_{530} = 27,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Ros Barceló y cols. 2002). La actividad peroxidasa también se midió con los precursores de las ligninas a una concentración de 0,1 mM: alcohol *p*-cumarílico ( $\epsilon_{259} = 14,756 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), alcohol coniferílico ( $\epsilon_{262} = 9,75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), alcohol sinapílico ( $\epsilon_{271} = 4,14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), *p*-cumaril aldehído ( $\epsilon_{324} = 20,732 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), coniferil aldehído ( $\epsilon_{341} = 13,44 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y sinapil aldehído ( $\epsilon_{340} = 11,95 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Ros Barceló y Pomar 2001). La reacción enzimática se inició mediante la adición de la enzima. Los resultados se expresan en nkatales. Un katal es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un mol de sustrato por segundo.

## II.5. Efecto de inhibidores sobre la actividad siringaldazin-peroxidasa

La actividad siringaldazin-peroxidasa se determinó a 25°C en un medio de reacción estándar compuesto por siringaldazina 50  $\mu\text{M}$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM en tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0, usando un  $\epsilon_{340}$  de 27 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

El efecto del ácido ferúlico y de la tropolona se estudió preparando medios de reacción que contenían ácido ferúlico o tropolona a una concentración de 1 mM (Ros Barceló y cols. 2000).

El efecto del ferrocianuro potásico se estudió preparando medios de reacción que contenían ferrocianuro potásico a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . En el caso del ferricianuro potásico se comprobó su efecto a una concentración de 1 mM (Ros Barceló y cols. 2000). El efecto de la azida sódica se estudió preparando medios de reacción que contenían azida sódica a una concentración de 1 mM (Pomar y cols. 2004). Los inhibidores se añadieron al medio 1 minuto antes de iniciar la reacción con la adición de la siringaldazina.

## II.6. Determinación de la cantidad de proteínas

Para la determinación de las proteínas se siguió el método de Bradford (1976). Se utilizó para ello el reactivo de Bradford comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó seroalbúmina bovina como proteína estándar para realizar la recta patrón.

## III. Análisis electroforéticos

### III.1. Isoelectroenfoque en equilibrio

Se usaron geles comerciales de poliacrilamida, Ampholine PAGplate, de Pharmacia-Biotech, con una concentración T=5% y C=3%, y un rango de pH de los geles de 3,5-9,5. Para mantener la temperatura constante a 7°C se recurrió a un estabilizador de temperatura Multi Temp III de Pharmacia-Biotech. El gel se desarrolló

empleando un sistema Multiphor II de Pharmacia. En el interior de la cubeta se situaron dos vasos con una solución de NaOH 1 M en la que pudiera disolverse el CO<sub>2</sub> desprendido durante la electroforesis, ya que el CO<sub>2</sub> puede causar variaciones en el gradiente de pH.

#### *Cargado de las muestras y desarrollo del isoelectroenfoque*

Sobre la placa de porcelana se extendió una gota de keroseno que permite una temperatura uniforme. Se colocó el gel y las bandas de isoelectroenfoque de Pharmacia impregnadas en las soluciones de los electrodos: en el cátodo, NaOH 1 M y en el ánodo, ácido fosfórico 1 M. Para cargar las muestras se usaron papeles de aplicación de Pharmacia de 5 x 2 mm. El volumen de carga fue de 10-30 µl según la actividad peroxidasa que presentasen. Las condiciones de desarrollo para un gel de 24,5 cm fueron de 1500 V, 50 mA y 30 W. Para geles de distinta longitud, se ajustaron los dos últimos parámetros proporcionalmente. El tiempo del isoelectroenfoque fue de 110 minutos.

Para el revelado de las isoenzimas de la peroxidasa se usó un medio de tinción con 4-metoxi- $\alpha$ -naftol (4-MN) 1 mM, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,33 mM, en tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0. Los geles se incubaron en este medio durante 15 minutos a 25°C en oscuridad. Se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante (López-Serrano y cols. 2004).

### **III.2. Isoelectroenfoque en no equilibrio**

La preparación de los geles y el proceso de polimerización se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Wrigley (1971) con algunas modificaciones. Los análisis electroforéticos se realizaron en un sistema MiniProtean 3 (Bio-Rad). Los geles tuvieron unas dimensiones de 8,3 x 7,3 cm y 1,0 mm de grosor.

#### *Composición de los geles*

El medio de polimerización se componía de acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 6,5%; anfolinas de rango pH 3,5-10,0 al 2% (v/v) y glicerol al 5% (p/v). La mezcla se desgasificó usando una bomba de vacío durante 5 minutos y posteriormente se añadió persulfato amónico al 0,06% (p/v), y con una micropipeta se formaron láminas de gel que se dejaron polimerizar durante 90 minutos a 25°C.

#### *Preparación de las muestras*

Las muestras de proteínas se prepararon en un tampón que contenía glicerol al 60% (p/v) y anfolinas de rango pH 3,5-10,0 al 15% (v/v). Este mismo tampón de carga se utilizó para la disolución patrón de citocromo C (0,5% en volumen final). El citocromo C es un marcador visible de alto punto isoelectroenfoque que sirve para identificar el frente de electroforesis

#### *Desarrollo del isoelectroenfoque*

Como disoluciones de electrodo se usaron ácido acético 20 mM para el ánodo e hidróxido sódico 25 mM para el cátodo. El isoelectroenfoque se realizó a 4°C, usando una fuente de alimentación Power Pac 1000, a una intensidad de corriente máxima de 10 mA por gel (1 mA por calle), una diferencia de potencial constante de 200 V durante 90 minutos, seguida de otra de 400 V durante 15 minutos, y una potencia máxima de 150 W.

### **III.3. Electroforesis disociante (SDS-PAGE)**

Se realizó según el protocolo descrito por Laemmli (1970) con ligeras modificaciones. Las proteínas se desnaturalizaron por calentamiento en un baño en ebullición durante 10 minutos, en presencia de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, glicerol 8%, SDS 0,7% (p/v) y azul de bromofenol 0,01%. Como marcadores de peso molecular se utilizó un kit de marcadores preteñidos de amplio rango de peso molecular (Bio-Rad, 161-0318), compuesto por miosina (209.000 Da),  $\beta$ -galactosidasa (124.000 Da), seroalbúminabovina (80.000 Da), ovoalbúmina (49.100 Da), anhidrasa carbónica (34.800 Da), inhibidor de tripsina de soja (28.900 Da), lisozima (26.000 Da) y aprotinina (7.100 Da).

#### *Preparación de los geles y desarrollo de la electroforesis*

El gel separador (1 mm de espesor) se preparó con tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, conteniendo acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 10%, SDS al 0,1%, TEMED al 0,15% y persulfato amónico al 0,05%, dejándose 30 minutos para su polimerización. El gel concentrador se preparó con tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 conteniendo acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 4%, SDS al 0,1%, TEMED al 0,2% y persulfato amónico al 0,08%, dejándose 30 minutos para su polimerización. La migración de las bandas sobre el gel se llevó a cabo en tampón glicina 192 mM, Tris 25 mM, pH 8,3, conteniendo SDS al 0,1%. El voltaje aplicado, con una fuente de alimentación Bio-Rad Power-Pac 1000, fue de 200 V durante 45 minutos.

#### *Tinción de los geles con plata*

Las proteínas se tiñeron con el método de la plata (Oakley y cols. 1980) siguiendo el protocolo de Pharmacia (PlusOne Silver Staining Kit, Protein). Para ello, el gel se fijó durante 30 minutos en etanol al 40% y ácido acético al 10%. Posteriormente se incubó durante 30 minutos en una solución sensibilizadora que contenía glutaraldehído al 0,125%, tiosulfato sódico al 0,2%, acetato sódico al 6,8% y etanol al 30%. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua destilada y, seguidamente, se procedió a la tinción del gel con una solución de plata compuesta por nitrato de plata al 0,25% y formaldehído al 0,015% durante 20 minutos. Se volvió a lavar el gel con agua destilada (2 veces) y las proteínas se revelaron en una solución que contenía carbonato sódico al 2,5% y formaldehído al 0,0074%.

Finalmente, la reacción se detuvo con una solución que contenía EDTA-Na<sub>2</sub> al 1,46%. Los geles se preservaron en agua destilada hasta que se fotografiaron.

## IV. Análisis de ligninas

### IV.1. Tinción de ligninas

#### *Tinción de Weisner*

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

#### *Tinción con acriflavina*

Para poner de manifiesto la presencia de ligninas en las paredes celulares, las células se tiñeron con acriflavina al 0,1% (p/v), se lavaron con agua y, posteriormente, se observaron con un microscopio láser confocal Leica DM IRE2. Las muestras se excitaron con luz de 488 nm de un láser de argón y la fluorescencia verde de las imágenes se recogió con un filtro que permitía el paso del rango de longitudes de onda de 520-530 nm (Christiernin y cols. 2005).

#### *Tinción con naranja de acridina*

Al igual que la tinción anterior, el naranja de acridina pone de manifiesto la presencia de ligninas en las paredes celulares. Para ello, los cultivos celulares se tiñeron con acridina al 0,1% durante 15 minutos, se lavaron con agua y posteriormente se observaron con un microscopio confocal láser Leica DM IRE2. Las muestras se excitaron con luz de 488 nm de un láser de argón y la fluorescencia de las imágenes se recogió con un filtro que permitía el paso del rango de longitudes de onda de 505-530 nm (Ko y cols. 2004).

### IV.2. Obtención de paredes celulares

Para el aislamiento de paredes celulares se siguió el método descrito por Pomar y cols. (2002). El material vegetal se homogenizó con agua y se centrifugó 2 veces a 1000xg durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó 2 veces con Tritón X-100 al 1% en las mismas condiciones. El precipitado se volvió a lavar con agua hasta eliminar completamente el detergente (4 veces) también en las mismas condiciones de centrifugación. Se hicieron lavados con etanol absoluto, unas 3-4 veces en idénticas condiciones, hasta que el sobrenadante quedó transparente. Para secar las paredes, el precipitado se filtró sobre un filtro de celulosa y con vacío, lavándolo con etanol al 96% y con éter dietílico 2 veces. Después de dejar secar el material se obtuvo la fracción de las paredes celulares.

### IV.3. Medida de ligninas

Se utilizó el método del bromuro de acetilo (Iiyama y Wallis 1988). Para ello, se pesaron 5 mg de paredes celulares a las que se les añadió bromuro de acetilo al 25% (p/p) en ácido acético en un volumen de 5 ml. Esta mezcla se incubó a 70°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar, se añadieron 10 ml de NaOH 2N, y finalmente se enrasó a 100 ml con ácido acético. Tras dejar reposar las muestras, por si quedaba alguna partícula en suspensión, se midió la absorbancia a 290 nm frente a un blanco. Para calcular la concentración de ligninas se usó un factor de absorptividad de  $20,091\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$  según la estimación de Iiyama y Wallis (1988).

### IV.4. Oxidación de las paredes celulares con nitrobencono

La oxidación alcalina con nitrobencono de las paredes celulares y los análisis de HPLC de los productos obtenidos se llevaron a cabo según Pomar y cols. (2002) Para la reacción, 25 mg de paredes celulares se incubaron durante 150 minutos a 170°C en una mezcla de 2,5 ml de NaOH 2N y 0,25 ml de nitrobencono, usando para ello tubos pirex de tapón con teflón que se agitaron suavemente cada cierto tiempo. Al terminar el periodo de incubación los tubos se enfriaron y a cada uno se le añadió 5 ml de agua destilada, extrayéndose en un embudo de decantación con 5 ml de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Esta extracción se realizó tres veces con el fin de eliminar los productos de degradación del nitrobencono. El residuo acuoso de las tres extracciones se acidificó entonces a un pH entre 1,0 y 2,0 con HCl 5N. Una vez ajustado el pH se extrajo en un embudo de decantación con 5 ml de diclorometano-acetato de etilo (1:1) repitiendo esta extracción tres veces. El conjunto de extracciones se juntaron en un único volumen, se le añadió  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en exceso, y tras haberlo filtrado se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio (Buchi R-200). El residuo final se disolvió en metanol, se pasó a través de un filtro de tamaño de poro de  $0,45\ \mu\text{m}$  ajustándose el volumen final de nuevo a 1 ml de metanol.

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

## IV.5. Tioacidolisis

La técnica empleada es la descrita por Lapierre y cols. (1995). Para llevar a cabo la reacción se pesaron 15 mg de las paredes celulares y se mezclaron con 10 ml de la disolución  $\text{BF}_3$  eterato 0,2 M en una mezcla 8,75/1 (v/v) dioxano/EtSH. La tioacidolisis se realizó en un tubo de vidrio pirex de tapón con teflón en un bloque metálico a 100°C durante 4 horas, agitando suavemente cada cierto tiempo.

Una vez transcurridas 4 horas, se añadieron 30 ml de agua con el fin de detener la reacción y enfriar la mezcla. Seguidamente, se ajustó el pH de la mezcla a un valor entre 3,0 y 4,0 con una solución 0,4 M de carbonato sódico.

Una vez ajustado el pH, se procedió a la extracción con 30 ml de diclorometano, usando para ello un embudo de decantación. Esta extracción se realizó tres veces, tras lo cual los volúmenes obtenidos se juntaron, añadiéndose  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en exceso para eliminar el agua arrastrada. A continuación, se procedió a la evaporación hasta sequedad del diclorometano en un evaporador rotatorio (Buchi R-200) a 40°C. El residuo final se disolvió en 0,2 ml de diclorometano para las muestras de suspensiones celulares y en 0,5 ml para las muestras procedentes de plantas. Finalmente, 10  $\mu\text{l}$  de la solución se mezclaron con 100  $\mu\text{l}$  de BSTFA y 10  $\mu\text{l}$  de piridina (grado GC), y los trimetil-silil derivados se analizaron con un equipo de CG-espectroscopía de masas Trace GC (Thermo Finnigan).

### *Análisis de los trimetil-silil derivados en cromatografía de gases-espectrometría de masas*

Para el análisis de las muestras anteriormente obtenidas, se utilizó un cromatógrafo Thermo Finnigan Trace GC, equipado con una columna DB-XLB, J&W, de 60 m x 0,25 mm de diámetro interno, usando helio como gas portador a un flujo constante de 1 ml  $\text{min}^{-1}$ . El programa de temperatura fue desde 90°C hasta 270°C, a una velocidad de 5°C  $\text{minuto}^{-1}$ . El cromatógrafo se acopló a un detector de masas Thermo Finnigan Polaris Q, que trabajó con una intensidad de impacto electrónico de 70 eV.

## V. Purificación de peroxidasas

### V.1. Obtención de la proteína extracelular de suspensiones celulares y precipitación de éstas con sulfato amónico

El medio extracelular en el que crecen los cultivos celulares vegetales puede considerarse como un amplio espacio intercelular que forma un continuo con la pared de la célula vegetal (van Huystee y Tam 1988). Por esta razón, las suspensiones celulares constituyen una fuente óptima de proteínas localizadas en la pared celular ya que el espacio intercelular, en este caso el medio extracelular, se obtiene directamente mediante técnicas no destructivas. Debido al hecho de que la mayor parte de la

actividad peroxidasa de las suspensiones celulares se segrega al medio de cultivo (80 %), sólo se utilizó como fuente de enzima el medio extracelular, el cual constituye una fuente continua e inagotable de enzima.

En los numerosos trabajos publicados sobre purificación de enzimas, puede observarse que una gran mayoría de ellos emplean, como paso inicial, la precipitación fraccionada con sulfato amónico. Este método está basado en la diferente solubilidad que presentan las proteínas en función de la concentración de sales, empleándose el sulfato amónico por su elevada solubilidad y permitiendo obtener disoluciones mucho más concentradas que las obtenidas con sales como el NaCl o el KCl. Sin embargo, dadas las bajas concentraciones de proteína que presentan los medios de cultivo, y debido a que los volúmenes de medio eran realmente grandes, en nuestros ensayos, no se realizó una precipitación fraccionada, sino total, que sirviera más como medio de concentración que como medio de purificación, empleándose para ello el sulfato amónico al 95% de saturación.

Para ello, una vez que los cultivos de *B. pendula*, *G. biloba* y *C. revoluta* alcanzaron su fase estacionaria, se procedió a su filtrado sobre papel de filtro para separar las células del medio extracelular. La fracción filtrada se precipitó con sulfato amónico al 95% durante una hora y media a 4°C, y se centrifugó a 3500 xg durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó, y el precipitado se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y posteriormente se dializó durante toda la noche frente al mismo tampón. El producto de esta diálisis se centrifugó a 12500 xg durante 20 minutos a 4°C, y al sobrenadante se le añadió sulfato amónico 1,5 M. Este sobrenadante se volvió a centrifugar a 12500 xg durante 50 minutos a 4°C, se descartó el precipitado, y el sobrenadante se filtró para eliminar impurezas que pudiesen obturar las columnas de cromatografía, constituyendo éste la fracción inicial de proteína.

## **V.2. Purificación parcial de peroxidasas de *B. pendula***

Para llevar a cabo la purificación se usó el sistema cromatográfico Econo System de Bio-Rad. El volumen de medio extracelular del que se partió para precipitar la proteína fue de 5 litros.

### **V.2.1. Cromatografía hidrofóbica sobre Phenil- Sepharosa™ 6 Fast Flow**

Este tipo de cromatografía está basado en la hidrofobicidad diferencial de las proteínas mostrada bajo ciertas condiciones del medio que las rodea. Entre estas condiciones, la que más se utiliza para facilitar la exposición de las zonas hidrofóbicas internas, destaca el sulfato amónico a concentraciones que suelen oscilar entre 1-2,5 M. La matriz más empleada para fijar las proteínas por hidrofobicidad es la fenil-Sepharosa, gel utilizado con éxito en la purificación de la peroxidasa de tomate, de soja y de *Z. elegans* (Flurkey y cols. 1978, Jen y cols. 1980, Gabaldón y cols. 2005),



por lo que ha sido, y sigue siendo, uno de los pasos intermedios más utilizado para la purificación de las peroxidasas.

Chavez y Flurkey (1984), trabajando con columnas de geles empaquetados modificados con diferentes grupos funcionales (alquilo o fenilo), observaron que la peroxidasa de rábano y tomate, bajo condiciones de interacción hidrofóbica, se ligan en mayor extensión a los geles modificados con grupos fenilo. En base a esto, sugirieron que la interacción de la peroxidasa con estos geles, además de ser hidrofóbica, también presenta una adsorción bioespecífica que debe estar basada en la similitud estructural que tienen los grupos fenilo con la mayoría de los sustratos naturales de la enzima (fenoles).

Puesto que este gel parece eliminar una gran cantidad del material que absorbe a 280 nm y, además, posee una alta capacidad para retener proteínas, resulta ser un método idóneo como paso inicial en la purificación de una peroxidasa. Con este propósito se realizó esta primera cromatografía partiendo de una concentración de sulfato amónico de 1,5 M y disminuyendo esta concentración con un gradiente lineal.

La columna de Phenil-Sepharosa™ 6 Fast Flow ( $V_T= 52$  ml) fue empaquetada y equilibrada con sulfato amónico 1,5 M en Tris-HCl 50 mM pH 7,5. La muestra de proteína resuspendida en Tris-HCl 50mM pH 7,5, con 1,5 M de sulfato amónico se aplicó sobre el gel. Tras aplicar la muestra de proteína, la cromatografía se realizó con el siguiente gradiente decreciente de sulfato amónico: i) 0-100% de tampón B, minutos 0-200; y ii) 100% de tampón B, minutos 200-500; utilizando como tampón A sulfato amónico 1,5 M en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, y como tampón B, Tris-HCl 50 mM pH 7,5. La cromatografía se realizó a un flujo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$  recogiéndose fracciones de 5 ml.

### **V.2.2. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sepharosa™ Fast Flow**

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

La columna de SP-Sepharosa™ Fast Flow ( $V_T= 55$  ml) fue empaquetada y equilibrada con tampón ácido 3-[Ciclohexilamino]-1-propano-sulfónico (CAPS) 50 mM pH 9,5. La muestra de proteína procedente de la cromatografía hidrofóbica, se concentró y simultáneamente se dializó frente a tampón CAPS 50 mM pH 9,5, usando el sistema de filtros de membrana Amicon Ultra-15 (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). Tras aplicar la muestra, la cromatografía se realizó con un programa que incluyó un gradiente ascendente de pH efectuado con dos tampones. Este gradiente consistía en:

i) 0% de tampón B, minuto 0-120; ii) 0-100% de tampón B, minuto 120-270; y iii) 100% de tampón B, minuto 270-360; siendo el tampón A CAPS 50 mM pH 9,5, y el tampón B, CAPS 50 mM pH 11,5. La cromatografía se llevó a cabo con un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> recogiendo fracciones de 1 ml. Las fracciones obtenidas se volvieron a cromatografiar sobre la misma resina en iguales condiciones para obtener fracciones más limpias.

### **V.2.3. Cromatografía de intercambio iónico sobre Q Sepharosa™ Fast Flow**

La fracción proteica no retenida por la columna de SP-Sepharosa se cromatografió en una resina de intercambio aniónico. En este caso se utilizó una resina fuertemente aniónica con un grupo amonio cuaternario. La columna de Q-Sepharosa™ Fast Flow ( $V_T = 54$  ml) fue empaquetada y equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 7,5. La muestra procedente de la cromatografía catiónica se concentró y, simultáneamente, se dializó frente al tampón anterior usando el sistema de filtros de membrana Amicon Ultra-15 (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). Tras aplicar la muestra, la cromatografía se realizó con un programa que incluyó un gradiente iónico efectuado con dos tampones. Este gradiente consistió en: i) 0% de tampón B, minuto 0-120; ii) 0-100% de tampón B, minuto 120-240; y iii) 100% de tampón B, minuto 240-360; siendo el tampón A Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y el tampón B, Tris-HCl 50 mM y KCl 2,5 M pH 7,5. La cromatografía se llevó a cabo con un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> recogiendo fracciones de 1 ml.

### **V.3. Purificación de una peroxidasa básica de *G. biloba***

Para la purificación de la peroxidasa se siguió el protocolo descrito por Gabaldón y cols. (2005), con modificaciones. El volumen de fluido extracelular del que se partió para precipitar la proteína fue de 8,4 litros.

#### **V.3.1. Cromatografía hidrofóbica sobre Phenil- Sepharosa™ 6 Fast Flow**

Esta cromatografía sobre Phenil-Sepharosa™ 6 Fast Flow ( $V_T = 65$  ml) se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas en el apartado V.2.1.

#### **V.3.2. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sepharosa™ Fast Flow**

La columna de SP-Sepharosa™ Fast Flow ( $V_T = 66$  ml) fue empaquetada y equilibrada como se señala en el punto V.2.2, al igual que la preparación de la muestra. El programa utilizado se basó en un gradiente ascendente de pH, usando para ello los mismos tampones que en el punto V.2.2. y con el siguiente gradiente: i) 0% de tampón B, minuto 0-30; ii) 0-100% de tampón B, minuto 30-130; y iii) 100% de

tampón B, minuto 130-230. La cromatografía se llevó a cabo con un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> recogiendo fracciones de 1 ml.

### V.3.3. Cromatografía de afinidad sobre Concanavalina A-Sepharosa<sup>®</sup> 4B

La naturaleza glicoproteica de las peroxidasas (más concretamente la presencia de unidades manosa en sus glicanos) hace que estas enzimas puedan ligarse a las lectinas como la Concanavalina A (Rodríguez Maraño y van Huystee, 1994). El uso de la Concanavalina A, unida a una matriz de Sepharosa 4B, se ensayó inicialmente para la purificación de la peroxidasa de rábano (Brattain y cols. 1976) y, desde entonces, es frecuentemente utilizada en los esquemas de purificación de dicha enzima.

La columna de Concanavalina A-Sepharosa<sup>®</sup> 4B ( $V_T = 19$  ml) fue empaquetada y equilibrada con el tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 1 mM, Cl<sub>2</sub>Ca 1 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 1 mM y Cl<sub>2</sub>Mn 1 mM. La muestra de proteína procedente de la cromatografía anterior se concentró y, simultáneamente, se dializó frente al tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, usando el sistema de filtros de membrana Amicon Ultra-15 (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). Tras aplicar la muestra, se inició un programa en el que se eluyó la proteína con un gradiente de metil- $\alpha$ -manopiranosido: i) 0% de tampón B, minuto 0-120; ii) 0-100% de tampón B, minuto 120-220; y iii) 100% de tampón B, minuto 220-320; donde el tampón B contenía 0,5 M de metil- $\alpha$ -manopiranosido. La cromatografía se llevó a cabo con un flujo de 0,5 ml min<sup>-1</sup> recogiendo fracciones de 1 ml.

### V.3.4. Cromatografía de intercambio iónico sobre SP Sepharosa<sup>™</sup> Fast Flow

De la cromatografía de afinidad anterior se obtuvo una muestra de proteína que quedó retenida por la Concanavalina A. Esta muestra se concentró y dializó frente a tampón CAPS 50 mM pH 9,5, usando el sistema de filtros de membrana Amicon Ultra-15 (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). Finalmente, se cromatografió en la misma resina de intercambio iónico utilizada previamente y en las mismas condiciones descritas en el apartado V.3.2.

## V.4. Purificación de peroxidasas de *C. revoluta*

El volumen de medio extracelular del que se partió para precipitar la proteína fue de 11 litros.

### V.4.1. Cromatografía hidrofóbica sobre Phenil-Sepharosa<sup>™</sup> 6 Fast Flow

Esta cromatografía sobre Phenil-Sepharosa<sup>™</sup> 6 Fast Flow ( $V_T = 66$  ml) se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas en el apartado V.2.1.

#### V.4.2. Cromatografía de intercambio iónico sobre Q Sepharosa™ Fast Flow

La columna de Q-Sepharosa™ Fast Flow ( $V_T = 20$  ml) fue empaquetada y equilibrada con tampón L-histidina 20 mM con  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{MnCl}_2$  1mM pH 6,0. La muestra proteica procedente de la cromatografía hidrofóbica, se concentró y simultáneamente se dializó frente al tampón anterior, usando el sistema de filtros de membrana Amicon Ultra-15 (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). Tras aplicar la muestra, la cromatografía se realizó con un programa que incluyó un gradiente iónico efectuado con dos tampones. Este gradiente consistía en: 0% de tampón B, minuto 0-75; 0-100% de tampón B, minuto 75-195; 100% de tampón B, minuto 195-240; siendo el tampón A L-histidina 20 mM con  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{MnCl}_2$  1mM pH 6,0 y el tampón B, L-histidina 20 mM con  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MnCl}_2$  1mM y KCl 1,5 M pH 6,0. La cromatografía se llevó a cabo con un flujo de  $1 \text{ ml min}^{-1}$  recogiendo fracciones de 1 ml.

#### V.5. Medida del cociente de Reinheitszahl (Rz)

Para obtener este coeficiente, se midieron las absorbancias de la banda Soret ( $\lambda$ ) y la absorbancia a 280 nm de la proteína en tampón Tris-acetato 50 mM pH 5,0, en un espectrofotómetro Uvikon 923. El valor de Rz se calculó dividiendo los valores de la absorbancia de la banda Soret / absorbancia a 280 nm.

#### V.6. Efecto de reversión del $\text{HgCl}_2$

Para determinar la naturaleza paraperoxidasa (peroxidasa de bajo espín) de la peroxidasa de *G. biloba*, la proteína purificada se trató con  $\text{HgCl}_2$  en una razón estequiométrica de 1:1 (Yamazaki y cols. 1967).

### VI. Proteómica

Los análisis proteómicos se realizaron en la Plataforma de Proteómica del Parque Científico de Barcelona (PCB) y en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), de Madrid.

#### VI.1. Digestión de proteínas

La digestión trípica de las proteínas del medio extracelular de las suspensiones se llevó a cabo con la proteína soluble total, así como las peroxidases purificadas de *G. biloba* y *C. revoluta*. Además, en este último caso, la fracción de peroxidases ácidas se desarrolló en un gel disociante (SDS-PAGE) y se tiñó con azul de Coomassie. Las bandas de interés se recortaron manualmente con un bisturí para llevar a cabo el protocolo de digestión.

### *Digestión de proteínas en el PCB*

Las proteínas se digirieron en gel con tripsina (Promega, grado de secuenciación) en el robot automático Investigator ProGest de Genomic Solutions. Se recortaron las bandas del gel y se lavaron con bicarbonato de amonio y acetonitrilo. Las proteínas se redujeron con un tratamiento de DTT (ditiotreitól) 10 mM durante 30 minutos y se alquilaron con una solución de yodoacetamida 55 mM durante 15 minutos. Después de varios lavados secuenciales con bicarbonato amónico ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 25 mM y acetonitrilo, las proteínas fueron digeridas durante toda la noche a 37°C, con 0,27 nmoles de tripsina. Los péptidos trípticos se extrajeron de la matriz del gel con 10% ácido fórmico y acetonitrilo, los extractos se juntaron y se secaron en una centrífuga al vacío.

### *Digestión de proteínas en el CNB*

Las proteínas de interés incluidas en las bandas del gel, se recortaron manualmente, se depositaron en placas de 96 pocillos y se procesaron automáticamente en un Proteineer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Para la digestión protéica, las piezas de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y se trataron con acetonitrilo (Schevchenko y cols. 1996). Las proteínas se redujeron con DTT (ditiotreitól) 10 mM en bicarbonato amónico 25 mM, y se alquilaron con iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Las proteínas se digirieron con tripsina de cerdo modificada (calidad para secuenciación; Promega, Madison WI) a una concentración final de 15 ng/ $\mu\text{l}$  en bicarbonato amónico 25 mM durante 4 horas a 37°C. Los péptidos se eluyeron del gel con ácido trifluoroacético 0,5% en agua durante 30 minutos a 25°C.

## **VI.2. Adquisición de espectros de MS y MS/MS**

La espectrometría de masas es un método que determina con exactitud la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones en el vacío, permitiendo, de esta manera, la determinación concreta de la masa molecular. Para conseguir las huellas peptídicas, la proteína se digiere con un compuesto que la escinde por un sitio específico (normalmente se utiliza tripsina) y se determina las masas de cada uno de los péptidos resultantes (fragmentos trípticos). Estas masas se utilizan posteriormente para identificar estos péptidos realizando su búsqueda en las bases de datos.

En este método, los fragmentos peptídicos generados por el método anterior se fragmentan de nuevo obteniéndose como resultado fragmentos peptídicos más cortos, o fragmentos iónicos. Los espectros de fragmentación de los péptidos trípticos se utilizan para identificar ese péptido en las bases de datos (incluso en base de datos de secuencias de ADNc que se expresan en EST). En ambos casos, estas aproximaciones requieren que la proteína en cuestión haya sido identificada previamente por sus huellas peptídicas, y que los espectros de fragmentación de los péptidos trípticos se encuentren depositados en las bases de datos. Cuando este no es el caso, se puede realizar la secuenciación *de novo*. Mediante este método, los

fragmentos iónicos se generan, bien mediante degradación química secuencial del extremo N-terminal, o bien mediante la separación del fragmento iónico generado como se mencionó anteriormente, en un grupo de fragmentos más pequeños. Las diferencias de masas entre fragmentos secuenciales se corresponden con masas conocidas de los aminoácidos individuales, permitiendo, de esta manera, deducir la secuencia de la proteína, sin información correlativa adicional, directamente a partir de las secuencias depositadas en las bases de datos.

### ***Adquisición de espectros de MS y MS/MS en el PCB***

Los péptidos digeridos y extraídos de los geles bidimensionales se analizaron mediante espectrometría masas. Se emplearon las técnicas de ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF) y nano-electrospray (nanoESI). Los equipos utilizados fueron el MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) y el electrospray acoplado a un micro-cromatógrafo líquido (Q-TOF Global, Micromass Waters). Estos análisis se realizaron en la Plataforma de Proteómica del Parque Científico de Barcelona.

#### *Espectrometría MALDI-TOF/TOF*

En este caso, los digeridos se resuspendieron en 5 µl de una solución de ácido trifluoroacético 0,1% y acetonitrilo 50%. Una alícuota de 0,5 µl se mezcló con el mismo volumen de una solución matriz, 2 mg/ml de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Aldrich) en una solución de ácido trifluoroacético 0,1% y acetonitrilo 50%. Para la determinación de la masa molecular de la proteína intacta, la solución conteniendo la proteína fue concentrada en una micro columna de C<sub>18</sub> y la proteína fue eluída directamente sobre la placa de MALDI con una solución de matriz CHCA (2mg/ml) en 75% de acetonitrilo y 0,1% TFA. El análisis se realizó con los parámetros empleados para la adquisición de espectros de masas en modo lineal. Los tres picos mayoritarios se seleccionaron para ser caracterizados por análisis MS/MS. Los datos provenientes del espectro se compararon con los de la base de datos utilizando el buscador Mascot.

#### *Espectrometría de masas ESI*

En el análisis por nano-electrospray los péptidos trópicos se separaron por cromatografía líquida *on-line acoplada* en tandem con espectrometría de masas (CapLC-nanoESI-Q-TOF; Micromass-Waters). En este caso, la muestra se resuspendió en 12 µl de una solución de ácido fórmico al 10 % y 4 µl se inyectaron en una columna capilar de fase reversa C<sub>18</sub> (75 µm de diámetro interno y 15 cm de longitud, PepMap column, LC Packings). Se utilizaron agujas de nano-ESI del tipo PicoTip™ (New Objective). Se aplicó un voltaje entre 1800-2200 V en la aguja y de 80 V en el cono. En la celda de colisión, CID (Collision Induced Dissociation) se aplicó un potencial de 20-35 eV y se empleó el argón como gas de colisión. Los datos se generaron en un formato PKL y se compararon con los de la base de datos mediante el buscador Mascot.

## **Adquisición de los espectros de MS y MS/MS en el CNB**

### *Espectrometría MALDI-TOF/TOF*

El espectro de masas MS se obtuvo mediante análisis automático en un espectrómetro de masas Bruker Reflex IV MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) mediante el software FlexControl 1.1. Los espectros obtenidos se procesaron con el software Xtof 5.1.1 para el análisis de datos crudos. Cada espectro se calibró internamente con dos iones de referencia provenientes de la autólisis de tripsina, concretamente con los péptidos de 842.510 Da y de 2211.105 Da, obteniéndose un error medio en la medida de la masa de  $\pm 30$  ppm en el rango entre 800-3000 m/z. Además, todos los contaminantes conocidos se excluyeron durante el proceso. Los parámetros usados para analizar los datos establecieron un umbral de fondo de 20 (relación señal/ruido) y una resolución superior a 4000 (FWHM). Para la identificación de proteínas, las masas de los péptidos trípticos se transfirieron a la interfaz BioTools 2.0 (de Bruker Daltonics) para buscar en la base de datos del NCBI nr usando el software Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com); Matrix Science, London, UK). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: carbamidometil cisteína como modificación fija debido al tratamiento con yodoacetamida, metioninas oxidadas como modificación variable, una tolerancia de masa peptídica de 80 ppm y tolerancia de hasta un sitio de rotura tríptica sin digerir. En todas las identificaciones proteicas, la probabilidad de puntuaciones fue superior a la mínima puntuación establecida como significativa con un valor-p menor de 0,05.

### *Espectrometría de masas ESI*

La ionización por electronebulización (Electrospray Ionisation, ESI) genera una amplia colección de iones metaestables fácilmente fragmentables, pero requiere una purificación previa de la muestra por cromatografía capilar de alta resolución (nano-HPLC). La confinación de los iones generados en una trampa iónica y su posterior fragmentación en una cámara de colisión, permite la obtención de información secuencial.

Para ello, el primer paso consistió en una digestión de la muestra, la cual, se disolvió en 180  $\mu$ l de tampón de digestión compuesto por urea 8 M, bicarbonato de amonio 25 mM, DTT 10 mM. Se incubó a 37°C durante 1 hora una alícuota correspondiente a 5  $\mu$ g (5  $\mu$ l). Posteriormente, se añadió yodoacetamida a una concentración final de 50 mM, y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en oscuridad. La muestra se diluyó 5X con bicarbonato de amonio 25 mM y se le añadió 1:25 de tripsina recombinante (Roche, Mannheim, Alemania) incubándose toda la noche a 37°C.

Los péptidos trípticos resultantes se secaron y se disolvieron en tampón ESI A (0,5% de ácido acético en agua). La cromatografía líquida del análisis ESI MS/MS se llevó a cabo de la siguiente manera: las fracciones se cargaron en una columna de fase reversa C18 de 100 mm x 100  $\mu$ M I.D. (New Objective, Woburn, MA), y se fraccionaron en un sistema cromatográfico Famos-Switchos-Ultimate (LCPackings,

Países Bajos) con un gradiente lineal del 5-40% de tampón ESI B (90% de acetonitrilo, 0,5% de ácido acético en agua) a 450 nl/min durante 90 minutos. Los péptidos eluidos de la columna se analizaron directamente en un espectrómetro de masas de trampa iónica Esquire 3000<sup>Plus</sup> (Brucker Daltonics, Bremen, Alemania). En algunas muestras se utilizó un espectrómetro de masas de trampa iónica HCT Ultra PTM (Brucker Daltonics, Bremen, Alemania). Los espectros de fragmentación MS/MS se obtuvieron mediante conmutación automática entre el modo MS y MS/MS usando exclusión dinámica. Las búsquedas en las bases de datos se llevaron a cabo a través de las últimas versiones de las bases de datos NCBI nr y SwissProt utilizando el software MASCOT (<http://www.matrixscience.com/home.html>).

### **VI.3. Secuenciación N-terminal de la peroxidasa de *G. biloba***

El método más directo para establecer la identidad de una proteína es el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de su estructura primaria. La composición de aminoácidos de una proteína se determina mediante la hidrólisis ácida (6 M HCl, 110°C, 24 h) de todos los enlaces peptídicos, y analizando posteriormente los aminoácidos resultantes mediante cromatografía. Este método nos indica el porcentaje de todos y cada uno de los aminoácidos que constituyen la proteína, pero no proporciona información acerca de su secuencia.

La determinación de la secuencia muchas veces implica la rotura de la proteína en un número determinado de pequeños péptidos, utilizando enzimas proteolíticas específicas como la tripsina, o compuestos químicos como el bromuro de cianógeno, que atacan sólo a determinados enlaces peptídicos. A continuación, cada péptido se somete a la degradación secuencial de Edman utilizando un secuenciador automático de proteínas. De esta manera, se separa el residuo N-terminal de cada péptido y se identifica mediante cromatografía. El ciclo se repite para identificar el siguiente aminoácido y así sucesivamente. Este método resulta muy laborioso y caro, por lo que la mayor parte de las proteínas se secuencian indirectamente a partir de la secuenciación del ADN del gen, o de su ADNc, y deduciendo la secuencia proteica a partir de la secuencia de bases. Este último método es más sencillo y rápido, pero no recoge las modificaciones post-traduccionales que pueden haber sufrido las proteínas.

Por lo tanto, la secuenciación directa por el método de Edman queda restringida a la determinación del extremo N-terminal, o a la identificación de una secuencia interna de la proteína, que proporciona una información valiosa para la construcción de un oligonucleótido que se utiliza posteriormente para amplificar el gen o el ADNc.

Previamente a la secuenciación del extremo N-terminal de la peroxidasa purificada de *G. biloba*, se tuvo que proceder a desbloquear el extremo N-terminal, lo cual es bastante frecuente en las peroxidasas (Kjærsgård y cols. 1997) Para ello, la proteína se incubó con piroglutamato aminopeptidasa (Sigma) en una relación 80/1 (p/p), durante 12 horas a 37°C. La secuenciación se realizó en un secuenciador modelo Procise 494 de Applied Biosystems. Los análisis de secuenciación del extremo



N-terminal se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid.

## **VII. Técnicas bioinformáticas**

### **VII.1. Búsqueda de secuencias en las bases de datos**

Las secuencias de las peroxidasas de la mayoría de las especies se han descargado de las bases de datos más importantes actualmente, como el National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Peroxibase (<http://peroxidase.isb-sib.ch/>), una base de datos exclusivamente de peroxidasas vegetales de clase III (Bakalovic y cols. 2006).

### **VII.2. Alineamientos de proteínas**

Los alineamientos de las secuencias por homología se llevaron a cabo mediante ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), programa que se encuentra en el portal del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI). ClustalW es un programa de alineamientos de secuencias múltiples para ADN o proteínas. Este programa construye el alineamiento de secuencias múltiples biológicamente significativas a partir de secuencias divergentes. Calcula, mediante algoritmos, el mejor resultado para las secuencias seleccionadas y las alinea de manera que las similitudes y diferencias entre las secuencias son fácilmente apreciables (Thompson y cols. 1994).

### **VII.3. Búsqueda de secuencias homólogas**

La búsqueda de secuencias homólogas se realizó mediante la técnica algorítmica BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a través de la página del EBI. El BLAST constituye una herramienta muy útil para la búsqueda de alineamientos locales básicos y proporciona información sobre la estructura y la función de la nueva proteína encontrada. Para realizar la búsqueda de las secuencias homólogas, se usaron dos herramientas blast, el NCBI-Blast2 (Pearson 1990) y el MPsrch (Smith y Waterman 1981). MPsrch es una herramienta que compara las secuencias mediante el algoritmo verdadero de Smith y Waterman, y permite una búsqueda más rigurosa en menos tiempo, mientras que Blast utiliza un método heurístico, por ello, MPsrch es capaz de identificar secuencias de forma exitosa donde Blast falla o incluso da falsos positivos.

En ambos casos, las condiciones en las que se realizó el blast fueron las especificadas por defecto en la página del EBI, excepto en aquellos casos en los que era necesario ampliar la búsqueda, para los cuales se disminuyó el umbral, o se quitó el filtro para encontrar un mayor número de secuencias.



*Resultados y discusión*



## I. Estudio de la actividad peroxidasa en callos

### I.1. Caracterización del crecimiento de callos

Los callos se han usado con frecuencia como sistemas modelo para estudiar los cambios temporales en el contenido de metabolitos y expresión enzimática relacionados con el desarrollo vegetal (Franz y cols. 1989, Krsnik-Rasol 1991, Peskan y cols. 1997).

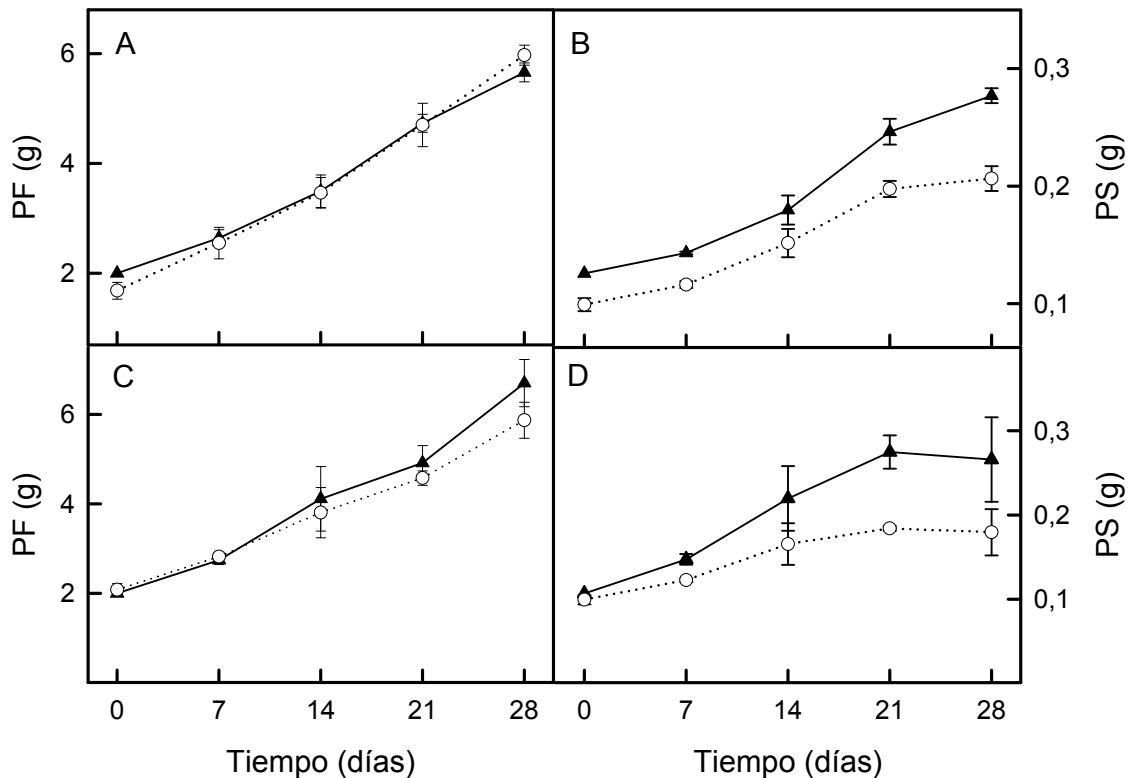
Es importante conocer el crecimiento de los callos para planificar estudios posteriores. La curva de crecimiento de los callos se determina midiendo el peso fresco y el peso seco. Sin embargo, la medida del peso seco es un criterio más fiable porque los callos, cuando se retiran del recipiente que los contiene, pierden agua y peso muy rápidamente.

En la bibliografía difiere el tiempo considerado para realizar una curva de crecimiento, desde 10 hasta 100 días (Wakamatsu y Takahama 1993, López Arnaldos y cols. 2002). Pero todas ellas coinciden en una primera fase de crecimiento lento, seguido de un crecimiento exponencial. Si el experimento se prolonga lo suficiente, se llega a una fase de senescencia.

En el caso de callos de *B. pendula* mantenidos a la oscuridad se observa que la curva de crecimiento (Figura 3.1A) es prácticamente constante, sin diferencias apreciables en la tasa de crecimiento a lo largo de todo el periodo estudiado, tanto valorando el peso fresco como el peso seco. Por otro lado, cuando se valora el peso fresco de los callos de *G. biloba* (Figura 3.1B) se puede observar una curva de tipo sigmoidal, con poco crecimiento en los primeros 7 días del cultivo, debido a la adaptación de los callos a las nuevas condiciones. A este periodo le sigue una fase de crecimiento exponencial, con la tasa máxima entre los 14 y los 21 días. El peso seco refleja de forma más precisa la evolución del crecimiento. En este caso sigue la misma curva que el peso fresco, pero difiere en el último estadio, en el que el peso fresco refleja un crecimiento más pronunciado. Sin embargo, el peso seco indica que los callos empiezan a entrar en la fase estacionaria.

Al igual que en callos a la oscuridad, en los callos mantenidos a la luz la tasa de crecimiento es más lenta al principio del subcultivo. En el caso de *B. pendula* (Figura 3.1C), la tasa de crecimiento máxima aparece a los 28 días. Por el contrario, en el caso de *G. biloba* (Figura 3.1D) se puede apreciar la fase de senescencia final y, además, la tasa máxima de crecimiento se sitúa a los 14 días, frente a los 21 días de la oscuridad.

En cualquiera de las dos especies, tanto las curvas del peso fresco como del peso seco son prácticamente paralelas, lo que indica que en este caso el peso fresco sigue siendo un buen indicador del crecimiento.



**Figura 3.1.** Curva de crecimiento de callos de *B. pendula* (A y C) y *G. biloba* (B y D) mantenidos a la oscuridad (A y B) y a la luz (C y D). PF = peso fresco (-); PS = peso seco (••).

En cuanto a la comparación de los valores de peso fresco y seco, tanto los callos mantenidos a la oscuridad como a la luz alcanzan unas cifras similares, con lo que se puede concluir que los callos de *B. pendula* y *G. biloba* pueden crecer en ambas condiciones ambientales. No obstante, las desviaciones son mayores en los callos en presencia de luz, con lo que el crecimiento de los callos en condiciones de oscuridad es más homogéneo, y por lo tanto, más adecuado para estudios posteriores.

Los callos de ambas especies mostraron síntomas de pardeamiento en las fases más avanzadas de su desarrollo, especialmente los de *B. pendula*, aunque este pardeamiento no pareció repercutir en su tasa de crecimiento. El pardeamiento de un tejido está causado por la oxidación de fenoles, lo que ocurre como consecuencia de una degradación celular (Lee y Whitaker 1995), aunque esto no es siempre necesario.

## 1.2. Determinación de la actividad peroxidasa en callos

Para determinar la actividad peroxidasa de callos mantenidos tanto a la oscuridad como a la luz, se tomaron muestras a los 7, 14, 21 y 28 días. En el caso de *B. pendula*, la máxima actividad peroxidasa se situó a los 14 días en el caso de los callos mantenidos a la oscuridad, y a los 28 días en los mantenidos a la luz. El fraccionamiento subcelular de estos callos (Tabla 3.1) reveló que la mayor parte de la actividad, utilizando 4-metoxi- $\alpha$ -naftol (4-MN) como sustrato, se localizó en la fracción soluble (no-sedimentable), estando el resto de la actividad asociada iónicamente a la pared celular y a la fracción de membranas.

**Tabla 3.1.** Actividad peroxidasa en las diferentes fracciones de callos de *B. pendula* mantenidos a la oscuridad y a la luz, usando 4-MN como sustrato.

Tiempo (días)	Fracciones	Actividad peroxidasa (nkat g <sup>-1</sup> PF)	
		Oscuridad	Luz
7	soluble	5,08±0,59	4,44±1,24
	iónica membrana	0,52±0,16	0,41±0,06
	iónica pared	0,52±0,07	0,41±0,03
14	soluble	12,22±3,16	3,83±1,30
	iónica membrana	0,79±0,20	0,38±0,11
	iónica pared	0,54±0,12	0,23±0,10
21	soluble	9,05±3,52	5,41±0,59
	iónica membrana	0,43±0,19	0,40±0,10
	iónica pared	0,55±0,24	0,33±0,09
28	soluble	12,32±3,83	5,47±1,03
	iónica membrana	0,54±0,11	0,43±0,08
	iónica pared	0,45±0,10	0,33±0,07

En el caso de los callos de *G. biloba*, la máxima actividad peroxidasa se encontró en la fracción soluble (Tabla 3.2), igual que en *B. pendula*, mientras que el resto se repartió casi equitativamente entre la fracción iónicamente ligada a la pared y la ligada de forma iónica a la membrana. Resultados similares fueron descritos por Escribano y cols. 2002 en *Beta vulgaris*. Al contrario que en *B. pendula*, los callos a la oscuridad mostraron la máxima actividad a los 21 días, mientras que los callos mantenidos a la luz presentaron un máximo a los 14 días. En los callos a la luz se mantuvo el mismo patrón en cuanto a la proporción de actividad peroxidasa en distintos compartimentos (Tabla 3.2), aunque varió el periodo de máxima actividad.

**Tabla 3.2.** Actividad peroxidasa en las diferentes fracciones de callos de *G. biloba* mantenidos a la oscuridad y a la luz, usando 4-MN como sustrato.

Tiempo (días)	Fracciones	Actividad peroxidasa (nkat g <sup>-1</sup> PF)	
		Oscuridad	Luz
7	soluble	6,97±2,85	2,81±0,54
	iónica membrana	0,52±0,14	0,05±0,03
	iónica pared	0,54±0,36	0,14±0,02
14	soluble	9,43±1,73	3,80±1,42
	iónica membrana	0,66±0,28	0,13±0,04
	iónica pared	0,51±0,31	0,16±0,05
21	soluble	13,48±1,93	3,03±0,84
	iónica membrana	0,72±0,14	0,08±0,02
	iónica pared	0,31±0,15	0,11±0,02
28	soluble	6,54±1,32	3,78±1,75
	iónica membrana	0,19±0,08	0,10±0,03
	iónica pared	0,44±0,11	0,34±0,10

Los callos mantenidos a la oscuridad presentaron niveles de actividad peroxidasa muy superiores a los callos mantenidos a la luz en todas las fracciones estudiadas, es decir, soluble, iónica de membrana e iónica enlazada a la pared (Tablas 3.1 y 3.2). Estos datos contrastan con los obtenidos por Bernal y cols. (1997), en callos de *Beta vulgaris*, los cuales mostraban siempre mayor actividad peroxidasa a la luz que a la oscuridad. Sin embargo, estos resultados concuerdan con Arezki y cols. (2001) con tejidos *in vitro* de *Eucalyptus camaldulensis*. Los tejidos cultivados a la luz presentaban mayor cantidad de compuestos fenólicos que los cultivados a la oscuridad, de forma inversa a la actividad peroxidasa. Esto último puede explicarse por uno de los papeles asignados a las peroxidasas, como es su participación en el catabolismo de las auxinas (Ros Barceló y Muñoz 1992, Savitsky y cols. 1999, Mathesius 2001): un incremento de la actividad peroxidasa normalmente significa menos auxina para el crecimiento. Se ha visto que los compuestos fenólicos, los polifenólicos y algunos monofenólicos como el ácido sinápico o el ferúlico, a bajas concentraciones, son inhibidores del catabolismo de las auxinas catalizado por las peroxidasas (Krylov y cols. 1993, Volpert y cols. 1995).

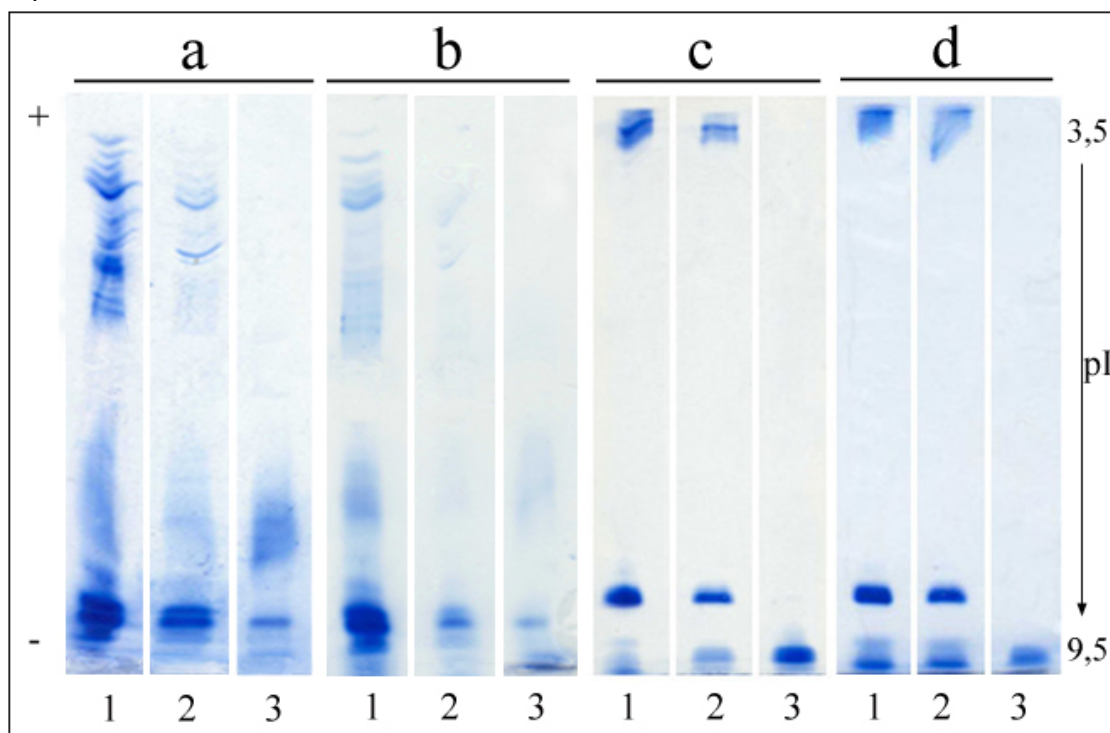
El repunte en la actividad peroxidasa a los 28 días en callos de *B. pendula* cultivados a la oscuridad puede deberse al pardeamiento observado. Se ha visto que tanto peroxidasas como polifenol oxidasas participan en el pardeamiento de los cultivos *in vitro* (Dowd y Norton 1995, López-Serrano y Ros Barceló 1998) y que en algunos cultivos, el pardeamiento fue consecuencia de un elevado estrés oxidativo (Laukkanen y cols. 2000). Este hecho también podría explicar el aumento constante de actividad en los callos mantenidos a la luz, acorde con la progresión de su pardeamiento (Degl'Innocenti y cols. 2005).

Dentro de los diferentes estadios estudiados, los mayores niveles de actividad peroxidasa soluble coincidieron con la tasa de crecimiento máxima del cultivo. Estos datos concuerdan con los publicados por López Arnaldos y cols. (2002) en callos de fresa y de Souza y MacAdam (1998), que encontraron una actividad peroxidasa mayor en hojas de maíz en zonas con una activa división celular. Las peroxidasas están implicadas en la polimerización de componentes de la pared celular y en el control de la plasticidad de la misma (Hoson y cols. 1995, Passardi y cols. 2005), lo que influiría en la división celular (Cooper y cols. 1994). Por el contrario, estos resultados contrastan con los presentados por Thaker y cols. (1986) y Zheng y van Huystee (1992), que describen una correlación inversa entre la tasa de crecimiento y la actividad peroxidasa.



### I.3. Isoenzimas

Las peroxididasas son enzimas altamente polimórficas, que presentan un elevado número de isoenzimas. Cada isoenzima difiere frecuentemente en su especificidad de sustrato y su posible función. Por ello, se estudió el patrón de isoenzimas de ambas especies de callos durante su desarrollo.



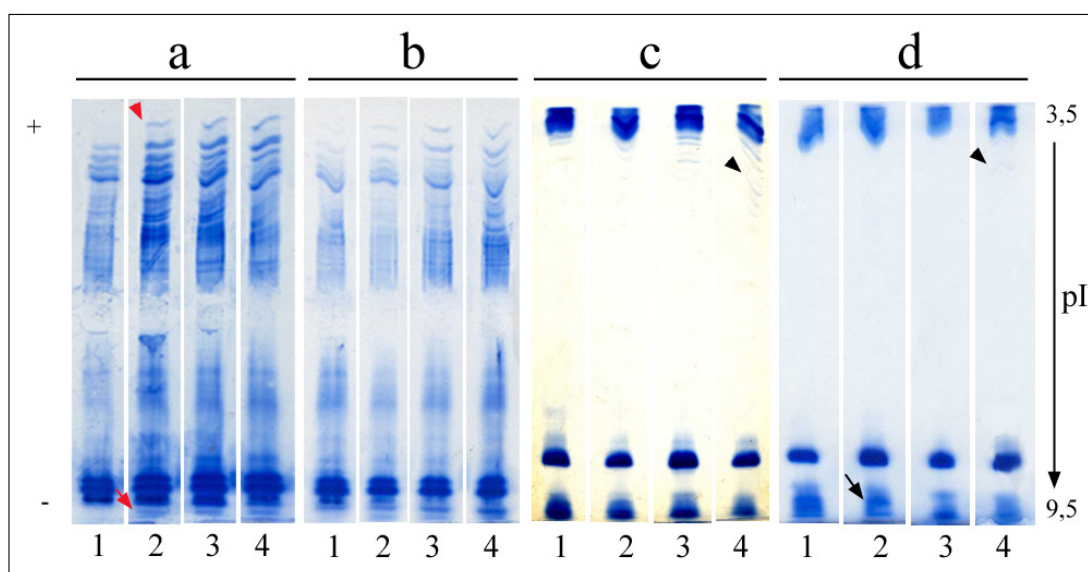
**Figura 3.2.** Isoelectroenfoque en condiciones de equilibrio de las fracciones soluble (1), iónica de membrana (2) e iónica de pared (3) de callos de *B. pendula* a los 14 días del subcultivo en la oscuridad (a) y en la luz (b), y de *G. biloba* a los 21 días del subcultivo en la oscuridad (c) y en la luz (d). Las isoenzimas de peroxididasas se revelaron con 4-MN y  $H_2O_2$ .

Los patrones de isoperoxidasas de las fracciones soluble, enlazada a membrana e iónicamente enlazada a la pared de callos se analizaron por isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 3,5-9,5 y se tñieron posteriormente con 4-MN y  $H_2O_2$ . En el caso de *B. pendula* el patrón de peroxididasas es el mismo en la fracción soluble (Figura 3.2, calles a1 y b1) e iónicamente ligada a la membrana (Figura 3.2, calles a2 y b2), mostrando peroxididasas básicas, neutras y ácidas. En la fracción ligada a la pared (Figura 3.2, calles a3 y b3) desaparecen las peroxididasas ácidas y neutras quedando únicamente dos peroxididasas muy básicas. El patrón observado es independiente de las condiciones de cultivo.

En el caso de *G. biloba* (Figura 3.2), al igual que en *B. pendula*, el patrón de peroxididasas es el mismo en la fracción soluble (Figura 3.2, calles c1 y d1) e iónicamente ligada a la membrana (Figura 3.2, calles c2 y d2), mostrando tanto peroxididasas básicas como ácidas. La única diferencia entre los callos cultivados a la luz y a la oscuridad es la mayor intensidad de la peroxidasa más básica en los callos mantenidos a la luz (Figura 3.2, calles d1-2). Las peroxididasas ácidas no están presentes en la fracción ligada a la pared, donde sólo aparece una de las

isoperoxidasas más básicas (Figura 3.2, calles c3 y d3). La colocación de isoperoxidasas básicas de alto pI en las fracciones soluble, ligada iónicamente a la membrana y a la pared celular fue anteriormente descrita por Ferrer y cols. (1992), Bernal y cols. (1993) y Sottomayor y cols. (1996) en hipocotilos de *Lupinus albus*, hojas de *Capsicum annuum* y de *Catharanthus roseus*, respectivamente.

Ya que la fracción peroxidasa soluble no-sedimentable presenta la mayor proporción de actividad peroxidasa (aproximadamente un 90%), y en ella aparecen la mayor parte de las isoenzimas peroxidasa, ésta fue la utilizada para posteriores estudios del patrón de isoenzimas a lo largo del crecimiento del callo.



**Figura 3.3.** Isoelectroenfoque de la fracción soluble de callos de *B. pendula* (a y b) y de *G. biloba* (c y d) mantenidos en la oscuridad (a y c) y en la luz (b y d), a los 7 días (1), 14 días (2), 21 días (3) y 28 días (4). Las isoenzimas de peroxidasa se revelaron con 4-MN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En el caso de callos de *B. pendula* (Figura 3.3, calles a y b) no existen diferencias en cuanto al patrón de peroxidasas a la luz y a la oscuridad. A lo largo del desarrollo, y a partir de los 7 días aparecen una banda básica de alto pI (flecha roja) y una banda muy ácida (punta de flecha roja), que se mantienen durante el resto del periodo ensayado, tanto en condiciones de luz como de oscuridad.

En la fracción soluble de callos de *G. biloba* en la oscuridad, y en cuanto a las isoenzimas básicas, se observa el mismo patrón de isoperoxidasas independientemente de los días ensayados (Figura 3.3, calles c y d). Sin embargo, la cantidad de peroxidasas ácidas en la oscuridad aumenta conforme el desarrollo de los callos (puntas de flecha negras). Este hecho no ocurre en los callos cultivados a la luz, donde por el contrario, desaparece una banda básica a los 21 días (flecha negra). Esta última peroxidasa podría expresarse en condiciones de oscuridad, y que aparezca en los primeros estadios del cultivo a la luz podría deberse a que todavía se estén aclimatando los callos a las nuevas condiciones de cultivo.

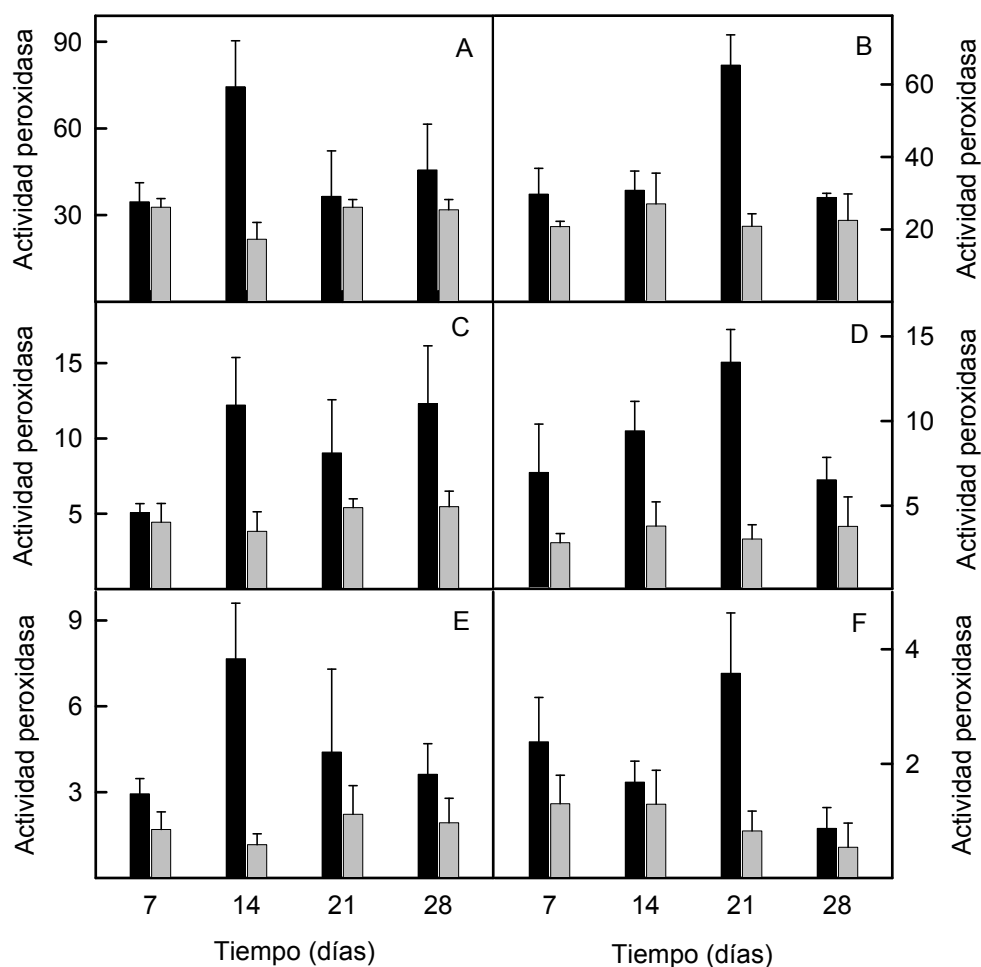
Estos cambios no resultan extraños puesto que la luz es un factor que produce cambios en el patrón de expresión de las proteínas. La transferencia de callos de la

oscuridad a la luz suele ir acompañado de alteraciones tanto en la actividad peroxidasa como en los patrones de isoenzimas, indicando la existencia de un sistema regulatorio diferente de esta actividad (Bernal y cols. 1997). Por ejemplo, se ha visto que la luz aumenta la proporción de elementos traqueales en diferenciación en callos de *Pinus radiata* (Möller y cols. 2006) y en suspensiones celulares de *Populus tremula* x *P. tremuloides* (Ohlsson y cols. 2006). También se ha visto que al exponer suspensiones celulares a la luz se activa la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) como respuesta al estrés, induciendo el metabolismo fenilpropanoide (Mader y Hanke 1997). Sin embargo, en los callos mantenidos a la luz, la actividad peroxidasa disminuye con respecto a los mantenidos en oscuridad, a pesar de tratarse de la enzima final de la ruta de biosíntesis de ligninas (Tablas 3.1 y 3.2).

#### **I.4. Determinación de la actividad peroxidasa en callos con otros sustratos**

Para completar el estudio de la actividad peroxidasa se utilizaron otros dos sustratos no fisiológicos, como son la tetrametilbenzidina-HCl (TMB) y la siringaldazina (Syr). Para este ensayo únicamente se usó la fracción de peroxidasa soluble, por ser la mayoritaria en los callos. Tanto en *B. pendula* como en *G. biloba* los resultados (Figura 3.4) muestran un patrón de actividad peroxidasa idéntico, independiente del sustrato utilizado, ya descrito anteriormente (Tablas 3.1 y 3.2).

Las diferencias que se aprecian se basan en la diferente afinidad que muestran las peroxidasas frente a los distintos sustratos. El más sensible es la TMB, ya que con ella se consigue la mayor actividad peroxidasa (López Arnaldos y cols. 2002, Mika y Lüthje 2003). Por el contrario, la capacidad de dicha enzima de oxidar la siringaldazina es bastante reducida. La oxidación de este sustrato se ha relacionado con la lignificación en un amplio rango de especies (Harkin y Obst 1973, Christensen y cols. 2001), por ser análogo a los grupos siringilo presentes en las ligninas. Las ligninas de angiospermas tienen una proporción similar de grupos siringilo (S) y guaiacilo (G); mientras que en las gimnospermas predominan los grupos G, y en menor proporción, los grupos H (hidroxifenilo) (Higuchi 1990). Basándonos en este hecho, no es sorprendente que las peroxidasas de *G. biloba*, como gimnosperma, tengan baja afinidad por la siringaldazina. Aún así es destacable que estas peroxidasas sean capaces de oxidar dicho sustrato. Las peroxidasas de callos de *B. pendula* oxidan la siringaldazina de manera poco eficiente. Esta baja afinidad se vio en otras angiospermas con la presencia contrastada de grupos S, como *Eucalyptus* (Aoyama y cols. 2001).



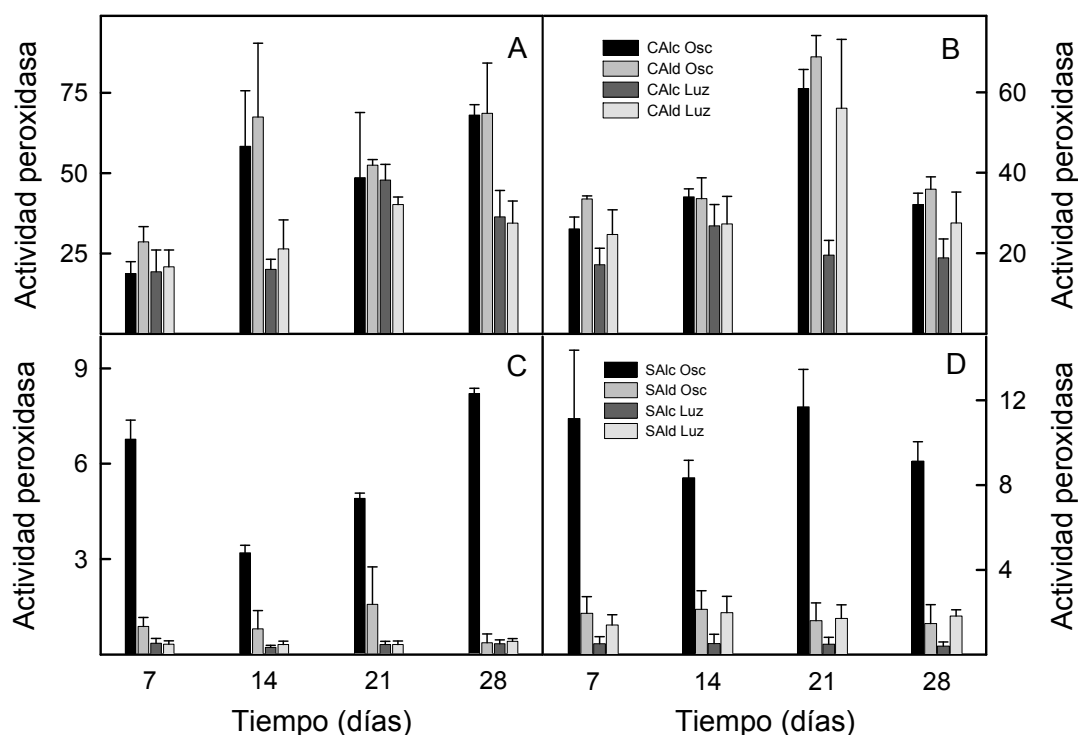
**Figura 3.4.** Actividad peroxidasa expresada en nkatalos  $g^{-1}$  PF de callos de *B. pendula* (A, C y E) y *G. biloba* (B, D y F) en la oscuridad (■) y en la luz (◼), usando como sustratos tetrametilbenzidina-HCl (A, B), 4-metoxi- $\alpha$ -naftol (C,D) y siringaldazina (E,F).

También se procedió a determinar la actividad peroxidasa con cuatro sustratos naturales, que se incluyen en la ruta de biosíntesis de las ligninas. Éstos son el alcohol coniferílico, el coniferilaldehído, el alcohol sinapílico y el sinapilaldehído.

En el caso de *B. pendula*, en callos mantenidos a la oscuridad (Figura 3.5A y C), el máximo se sitúa a los 28 días tras el subcultivo; y a los 21 días en los callos a la luz, difiriendo de las actividades halladas con otros sustratos, donde la máxima actividad peroxidasa se situaba a los 14 y 28 días, respectivamente. En el caso de callos de *G. biloba* mantenidos a la oscuridad (Figura 3.5B y D) se observa el mismo patrón en la actividad peroxidasa que usando otros sustratos (Figura 3.4), es decir, presenta un máximo a los 21 días. Sin embargo, en los callos mantenidos a la luz (Figura 3.5B y D), el patrón difiere con respecto a otros sustratos. Con coniferilaldehído el máximo se sitúa a los 21 días tras el subcultivo; mientras que con el 4-MN, la TMB y la Syr (Figura 3.4) la máxima actividad peroxidasa aparece a los 14 días.

Como la mayoría de las peroxidasas de clase III, las enzimas presentes en los callos de *G. biloba* y *B. pendula* presentan gran afinidad por el alcohol coniferílico (Ros Barceló y cols. 2003b) y por el coniferilaldehído (Figura 3.5). En gimnospermas no se ha descrito la presencia de la enzima CAld5H (Osakabe y cols. 1999), que permite la

síntesis de sinapilaldehído (y posteriormente unidades siringilo) a partir de coniferilaldehído, lo que explicaría la baja afinidad de las peroxidadas de *B. biloba* tanto por el alcohol sinapílico como por el sinapilaldehído. Estos resultados concordarían con la baja afinidad que presenta frente a la siringaldazina. Aún así, es notable señalar que a pesar de mostrar baja afinidad, es capaz de oxidar estos sustratos, principalmente el alcohol sinapílico. La existencia de peroxidadas de gimnospermas capaces de oxidar residuos siringilo ha sido descrita en *Picea abies* (Marjamaa y cols. 2006b), *Cryptomeria japonica* (Tsutsumi y cols. 1998) y *Picea sitchensis* (McDougall 2001) especies que carecen de ligninas de tipo S.



**Figura 3.5.** Actividad peroxidasa expresada en nkatales g<sup>-1</sup> PF de la fracción soluble de callos de *B. pendula* (A, C) y *G. biloba* (B, D) mantenidos en la oscuridad y en la luz, medida con alcohol coniferílico, coniferilaldehído (A y B), alcohol sinapílico y sinapilaldehído (C y D). CAlc= Alcohol coniferílico; CAld= coniferilaldehído; SAlc= alcohol sinapílico; SAld= sinapilaldehído; Osc= oscuridad.

Las peroxidadas presentes en la fracción soluble de callos de *B. pendula* (Figura 3.5A y C) presentan una baja capacidad para oxidar los precursores de las unidades siringilo, especialmente en los callos mantenidos en la luz. Sin embargo, presentan una alta afinidad por el alcohol coniferílico (Ros Barceló y cols. 2003b), aunque en este caso el sustrato que mejor oxidan es el coniferilaldehído.

La mayor actividad peroxidasa que se observa usando coniferilaldehído como sustrato en vez de alcohol coniferílico no es algo excepcional (Wallace y Fry 1999, Ros Barceló y Pomar 2001), a pesar de que la mayoría de los constituyentes de las ligninas proceden de los alcoholes cinamílicos. Se ha sugerido que los aldehidos cinamílicos también se incorporan al polímero en crecimiento de la lignina (Higuchi y cols. 1994, Lapierre y cols. 1995), lo que podría explicar la alta afinidad de la enzima por el coniferilaldehído.

### I.5. Caracterización de la actividad peroxidasa

Para caracterizar la actividad peroxidasa de la fracción soluble de callos de ambas especies se hizo un ensayo con inhibidores, utilizando como sustrato la siringaldazina. Los resultados se presentan en las Tablas 3.3 y 3.4.

**Tabla 3.3.** Efecto de los distintos inhibidores sobre la actividad peroxidasa de la fracción soluble de callos de *B. pendula* mantenidos en la oscuridad y en la luz. nd= no determinado

<i>Inhibidor</i>	<i>nkat de Syr g<sup>-1</sup> PF (oscuridad)</i>	<i>nkat de Syr g<sup>-1</sup> PF (luz)</i>
Control	9,55 ± 0,34	2,80 ± 0,14
Azida sódica 1mM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ácido ferúlico 1mM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tropolona 1mM	23,15 ± 3,96	5,44 ± 0,94
Ferrocianuro potásico 100µM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ferricianuro potásico 1mM	9,16 ± 0,46	nd

**Tabla 3.4.** Efecto de los distintos inhibidores sobre la actividad peroxidasa de la fracción soluble de callos de *G. biloba* mantenidos en la oscuridad y en la luz. nd= no determinado

<i>Inhibidor</i>	<i>nkat de Syr g<sup>-1</sup> PF (oscuridad)</i>	<i>nkat de Syr g<sup>-1</sup> PF (luz)</i>
Control	2,72 ± 0,51	1,13 ± 0,12
Azida sódica 1mM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ácido ferúlico 1mM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tropolona 1mM	29,17 ± 2,43	8,68 ± 0,56
Ferrocianuro potásico 100µM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Ferricianuro potásico 1mM	nd	1,10 ± 0,04

De forma general, se ha considerado hasta muy recientemente que las peroxidases son las enzimas implicadas en la etapa final de polimerización de las ligninas, ya que presentan una correlación tanto espacial como temporal con la lignificación de la pared celular. Para distinguir esta enzima de otras con una posible implicación en la lignificación se han desarrollado técnicas que usan inhibidores selectivos o, en su defecto, sustratos selectivos.

Aunque la peroxidasa sea capaz de oxidar grupos guaiacilo, no es un indicio directo de su participación en los procesos de lignificación, ya que este tipo de estructuras está presente en otros compuestos abundantes en plantas, como en los ésteres del ácido ferúlico unidos a la pared celular, o incluso en compuestos no relacionados con la lignina. Sin embargo, la capacidad que manifiesta la peroxidasa para oxidar los grupos siringilo permite suponer que esta peroxidasa está estrechamente ligada a los procesos de lignificación, ya que los grupos siringilo, con la excepción de ciertos lignanos (Lewis y Davin 1999), sólo están presentes en las ligninas.

El uso de los distintos inhibidores se realizó en la fracción soluble de los callos que presentaban mayor actividad peroxidasa, usando como sustrato la siringaldazina. Es decir, en los callos de *B. pendula* mantenidos en la oscuridad se usó como control la fracción soluble de 14 días. En el caso de los callos en la luz se comprobó el efecto

de los inhibidores en la fracción soluble de 21 días. Para los callos de *G. biloba* se usaron las muestras de 21 y 7 días para callos mantenidos en la oscuridad y en la luz, respectivamente.

El primer paso para caracterizar la actividad peroxidasa es el uso de la azida sódica, un inhibidor general de metaloproteínas. En este caso, la utilización de una concentración de 1 mM provocó una inhibición total de la actividad enzimática. Este dato permite afirmar que la enzima responsable de la actividad siringaldazina-peroxidasa es una metaloproteína, grupo dentro del cual se incluyen las peroxidasas (Pomar y cols. 2004). Como la azida sódica es un inhibidor general y no específico de peroxidasas, es necesario usar inhibidores más específicos.

El ácido ferúlico es uno de los mejores sustratos de la peroxidasa, debido a que tiene una alta constante de reacción con esta enzima y a que se acomoda muy bien en el sitio activo de la enzima (Henriksen y cols. 1999). Por estos motivos es uno de los mejores inhibidores competitivos de la peroxidasa (Pedreño y Ros Barceló 2000). Por otra parte, la tropolona es un inhibidor selectivo de las actividades de tipo catecolasas (Chabanet y cols. 1994, Udagama-Randeriya y Savidge 1995), y no tiene efecto inhibitor sobre las peroxidasas.

En las Tablas 3.3 y 3.4 se muestra que el ácido ferúlico 1 mM inhibe totalmente la oxidación de la siringaldazina por la peroxidasa. Como el ácido ferúlico no es sustrato de las polifenoloxidasas de tipo lacasa (Sterjiades y cols. 1992, Chabanet y cols. 1994, Ranocha y cols. 1999), se puede descartar que éstas sean responsables de la actividad siringaldazina-peroxidasa de la fracción soluble de los callos.

Sin embargo, el ácido ferúlico es también un inhibidor de la actividad catecolasa de las polifenoloxidasas (Udagama-Randeriya y Savidge 1995, Richardson y cols. 1997), y no se debe descartar que sean las catecolasas las responsables de la actividad siringaldazina-peroxidasa. Por este motivo se utilizó la tropolona, que no tuvo efecto inhibitor sobre la actividad enzimática. De este modo se puede descartar que sean las catecolasas las responsables de la oxidación de la siringaldazina, señalando que son las peroxidasas, con exclusividad, las responsables de dicho proceso.

Para confirmar este último dato, se utilizó la pareja ferrocianuro potásico/ferricianuro potásico. El primero es un sustrato de la peroxidasa (Henriksen y cols. 1999) y podría actuar como inhibidor competitivo de la enzima. Por otra parte, el ferricianuro potásico es un análogo químico del anterior pero no es sustrato de la peroxidasa. Con este último se pretende desechar que los resultados obtenidos con el ferrocianuro potásico se deban a efectos provocados por complejos tipo cianuro-hierro sobre las metaloproteínas, y no a su papel como sustrato de la peroxidasa.

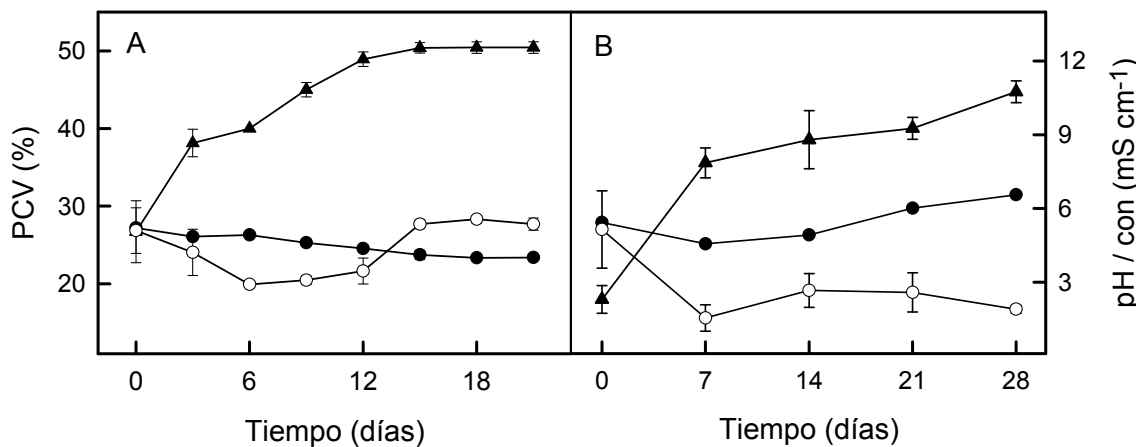
En las Tablas 3.3 y 3.4 se muestra que el ferrocianuro potásico causa una inhibición total de la actividad enzimática; mientras que el ferricianuro potásico no tiene efecto. Se concluye así que la responsable de la actividad siringaldazina-peroxidasa de callos de *B. pendula* y *G. biloba* es una peroxidasa.

## II. Estudio de la actividad peroxidasa en suspensiones celulares

### II.1. Caracterización del crecimiento de suspensiones celulares

A pesar de que los callos son una buena herramienta de investigación, es preferible el uso de suspensiones celulares para estudios de proteómica de la pared celular, o de purificación de proteínas, por la similitud entre el medio de cultivo y el espacio intercelular de las plantas (van Huystee y Tam 1988). Por ello, decidimos caracterizar previamente algunos parámetros de las suspensiones celulares que faciliten el trabajo posterior.

En una suspensión celular la tasa de crecimiento se puede medir determinando el número de células, el volumen de empaquetamiento celular, y el peso fresco y seco (Collin y Edwards 1998).



**Figura 3.6.** Parámetros de crecimiento de suspensiones celulares de *B. pendula* (A) y *G. biloba* (B). Volumen de empaquetamiento celular (▲), pH (●) y conductividad (○).

El empaquetamiento celular (PCV) da una idea de la tasa de crecimiento de la suspensión (Falco y cols. 1996, Gómez-Vásquez y cols. 2004). En las suspensiones de *B. pendula* (Figura 3.6A) se ve una clara fase exponencial de crecimiento que dura hasta los 12 días, donde la división es activa y el crecimiento, rápido. A partir de los 12 días desde el inicio de la suspensión las células entran en la fase estacionaria, donde la división se iguala con la lisis celular y el empaquetamiento se mantiene constante. En el caso de *G. biloba*, se dobla el volumen de empaquetamiento celular (Figura 3.6B) a los 7 días de iniciar las suspensiones. Tras este periodo, continúa el crecimiento, si bien no es muy notable: apenas aumenta un 10% en 21 días de cultivo. Para asemejarse a una típica curva de crecimiento (Falco y cols. 1996; Mitchell y Cowan 2003), falta la fase de muerte celular, provocada por la escasez de nutrientes en el medio, y la posible liberación al medio de metabolitos secundarios que pueden resultar tóxicos, y que aparecería en el caso de haber dejado los cultivos durante más tiempo, aunque ésta no es la práctica habitual (Ohlsson y cols. 2006). En ocasiones, los cultivos celulares presentan una fase *lag* de retardo en el crecimiento, debido a la



adaptación de las células a las nuevas condiciones, pero aquí se puede haber suprimido por el elevado empaquetamiento celular inicial.

Estos datos se ven apoyados por las medidas de conductividad. Este parámetro indica la concentración de sales disueltas en la suspensión. Un descenso de la conductividad se relaciona con el consumo de nutrientes por parte de las células en suspensión. Debe estar en relación inversa con el empaquetamiento celular, puesto que si aumenta el número de células, éstas consumirán más nutrientes y descenderá la conductividad.

En las suspensiones de ambas especies, la conductividad desciende de manera brusca cuando la tasa de crecimiento es mayor, lo que en *B. pendula* ocurre hasta los 6 días (Figura 3.6A) y en el caso de *G. biloba*, hasta los 7 días (Figura 3.6B). A continuación se da un periodo donde la conductividad se mantiene en los mismos valores a pesar de haber crecimiento celular. Cuando las suspensiones entran en la fase estacionaria, la conductividad aumenta y se mantiene en valores constantes.

Debido a fenómenos de metabolismo y nutrición, las células producen sustancias que expulsan al medio extracelular, entre ellas determinados metabolitos que alteran el pH, y pueden alcalinizar o acidificar el medio. Los resultados muestran que el pH de suspensiones de *B. pendula* disminuye progresivamente con el tiempo, y de manera poco importante (Figura 3.6A). En este caso, la variación del pH se debe a la lisis celular, dato que se ve complementado por los datos de la conductividad. Sin embargo, en las suspensiones de *G. biloba* desciende en los días iniciales de crecimiento de manera brusca (Figura 3.6B), luego se estabiliza y en estadios más avanzados del cultivo el pH vuelve a aumentar de forma notable, puesto que se incrementa en 2 unidades desde los 14 a los 28 días. Esto podría indicar que las células de *G. biloba* expulsan al medio sustancias que acidifican el fluido extracelular en los primeros estadios de desarrollo, mientras que en estadios posteriores expulsa metabolitos que alcalinizan el medio.

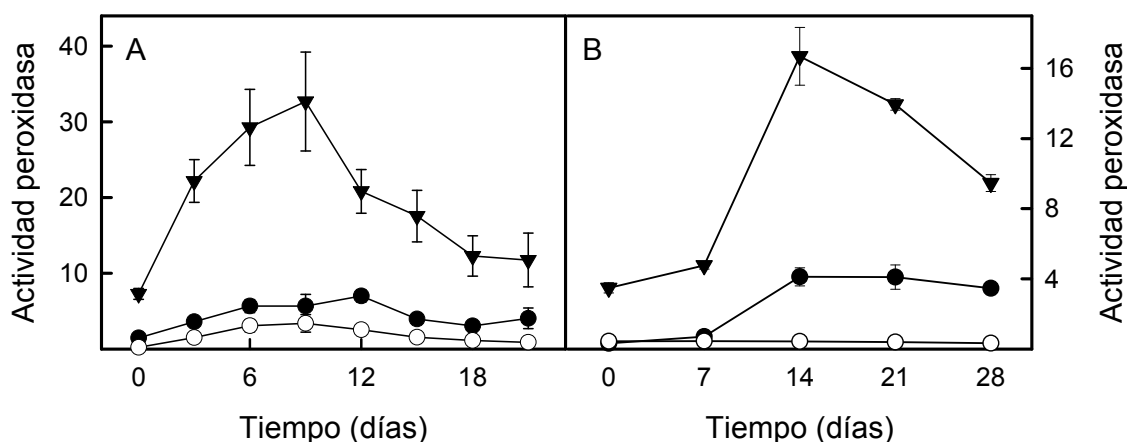
## II.2. Caracterización de la actividad peroxidasa en suspensiones celulares

Para caracterizar la actividad peroxidasa en suspensiones celulares de *B. pendula* y *G. biloba* se usaron los mismos sustratos que en los callos, tres sustratos no fisiológicos: 4-metoxi- $\alpha$ -naftol (4-MN), tetrametilbencidina (TMB) y siringaldazina (Syr) y cuatro sustratos naturales precursores de la lignina en su ruta de biosíntesis, el alcohol coniferílico, el coniferilaldehído, el alcohol sinapílico y el sinapilaldehído.

En las suspensiones de *B. pendula* (Figura 3.7A), la máxima actividad peroxidasa se presenta a los 9 días cuando se mide con TMB y siringaldazina, mientras que se retrasa hasta el día 12 usando 4-MN. Después de este día, la actividad enzimática desciende primero bruscamente y luego de forma más sostenida.

En el caso de *G. biloba* el máximo de actividad peroxidasa se presenta a los 14 días después de haber iniciado las suspensiones celulares, tanto usando 4-MN como TMB como sustratos (Figura 3.7B). Sin embargo, la oxidación de TMB disminuye a partir de este tiempo; mientras que la del 4-MN sólo disminuye ligeramente al final del

periodo analizado. En cualquier caso, la actividad peroxidasa es mayor utilizando TMB como sustrato. En el caso de la siringaldazina, la oxidación de este sustrato es muy pequeña, y no se puede considerar que haya diferencias entre los distintos días.

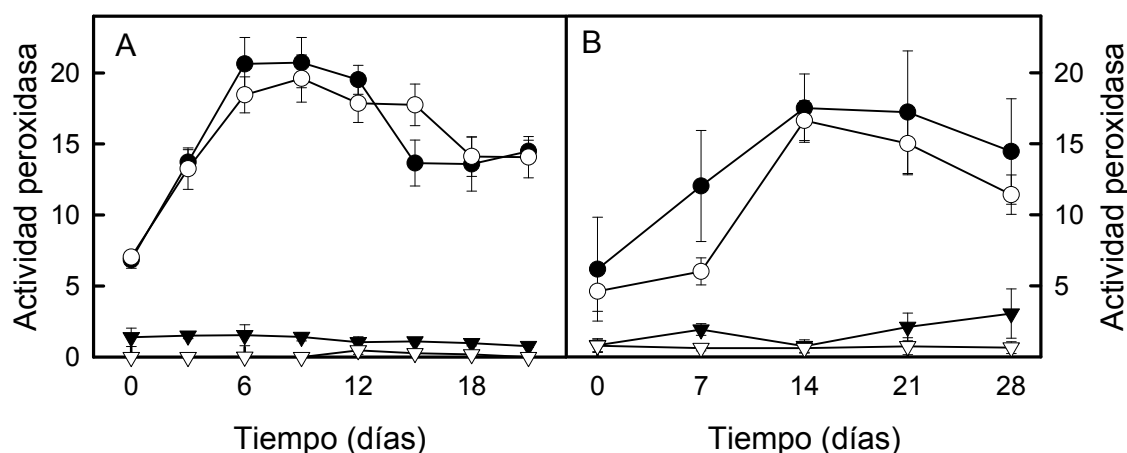


**Figura 3.7.** Actividad peroxidasa expresada en nkatales ml<sup>-1</sup> de medio extracelular de suspensiones celulares de *B. pendula* (A) y *G. biloba* (B) medida con 4-MN (●), Syr (○) y TMB (▼).

En el caso de *B. pendula* existe una coincidencia de la actividad peroxidasa con respecto al crecimiento celular, puesto que en la fase de crecimiento exponencial, la actividad peroxidasa aumenta y cuando el crecimiento disminuye o cesa, también lo hace la actividad de dicha enzima.

Por el contrario, en las suspensiones de *G. biloba* la máxima actividad peroxidasa se produce a la semana siguiente de que las suspensiones tengan su máxima tasa de crecimiento. Esto podría indicar que el aumento de actividad peroxidasa no está relacionado con los procesos de crecimiento, sino con procesos posteriores. Por el contrario, la máxima actividad peroxidasa en callos tanto mantenidos en la luz como en la oscuridad coincide con la máxima tasa de crecimiento (Figura 3.1B, D y Tabla 3.2).

Al igual que ocurría en los callos (Figura 3.5), cuando se ensayaron los sustratos naturales (Figura 3.8), de las peroxidases presentes en el medio extracelular de suspensiones celulares de *B. pendula* y *G. biloba*, éstas mostraron una alta afinidad tanto por el alcohol coniferílico como por el coniferilaldehído, con cierta inclinación hacia el primero. En las suspensiones de *B. pendula* se observa un máximo de actividad peroxidasa entre los 6 y los 12 días (Figura 3.8A), descendiendo posteriormente, tanto con alcohol coniferílico como con coniferilaldehído, apenas sin diferencia entre estos dos. Este intervalo coincide con el final de la fase de crecimiento exponencial, lo cual es lógico si estos sustratos indican la participación de la peroxidasa en los procesos de lignificación. En el caso de las suspensiones celulares de *G. biloba* (Figura 3.8B) se sigue el mismo patrón que con el resto de sustratos ensayados (Figura 3.7B), es decir, se presenta un máximo de actividad peroxidasa a los 14 días y un descenso posterior.



**Figura 3.8.** Actividad peroxidasa expresada en nkatal  $\text{ml}^{-1}$  de medio extracelular de suspensiones celulares de *B. pendula* (A) y *G. biloba* (B), medida con alcohol coniferílico (●), coniferilaldehído (○), alcohol sinapílico (▼) y sinapilaldehído (▽).

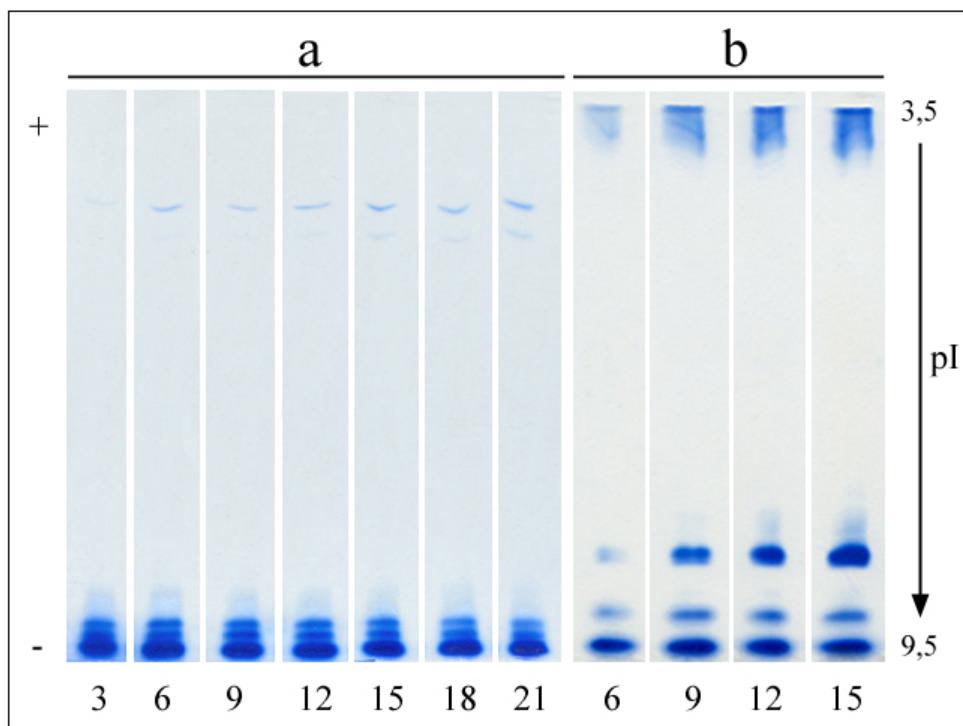
En ambas especies la actividad detectada con el alcohol sinapílico y el sinapilaldehído fue muy baja, aunque claramente detectable, fenómeno parecido al encontrado en la fracción soluble de los callos (Figura 3.5).

### II.3. Isoenzimas

Para visualizar el conjunto de peroxidasas se realizó un isoelectroenfoco en equilibrio (gradiente de pH de 3,5-9,5) del medio extracelular de las suspensiones celulares de *B. pendula* y *G. biloba*. En el caso de *B. pendula* (Figura 3.9a), no se observan diferencias en cuanto a las peroxidasas básicas entre los distintos días a lo largo del desarrollo. Sin embargo, según transcurren los días aparece una segunda banda ácida que se va haciendo más intensa. En comparación con la fracción soluble de los callos, en el medio extracelular de las suspensiones desaparece casi todo el complemento de peroxidasas ácidas, apareciendo únicamente, y de forma muy leve, dos peroxidasas de carácter poco ácido, de manera análoga a lo que ocurre en la fracción de peroxidasa que está ligada a la pared celular (Figura 3.2). Se mantienen las tres peroxidasas de pI más básico, aunque a diferencia de la que ocurre en callos, (Figura 3.3) la que se tiñe con más intensidad es la más básica.

En las muestras de *G. biloba* (Figura 3.9b) se observa la presencia tanto de bandas básicas como ácidas. No hay diferencias en el patrón de peroxidasas expresadas a lo largo del desarrollo, aunque varía la expresión de unas con respecto a otras, puesto que dos bandas básicas son más tenues a los 7 días. La banda de mayor punto isoeléctrico se mantiene igual durante todo el periodo estudiado. En comparación con la fracción soluble de los callos mantenidos en la oscuridad (Figura 3.3), aquí desaparecen las bandas ácidas, ya que sólo se mantienen las dos de menor pI. Mientras que en los callos la peroxidasa con más actividad es la menos básica, en

suspensiones celulares es la de mayor pI, coincidiendo con la banda que aparece en la fracción iónicamente ligada a la pared celular de los callos.



**Figura 3.9.** Isoelectroenfoque en equilibrio del medio extracelular de suspensiones celulares de *B. pendula* (a) y *G. biloba* (b) a distintos días del subcultivo. Las isoenzimas de peroxidasa se revelaron con 4-MN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Además de que las suspensiones son más deseables por la homogeneidad de sus células y el contacto de todas ellas con el medio de cultivo, en el caso de las especies estudiadas se reduce el número de isoenzimas de peroxidasa, por lo que el estudio de éstas es más sencillo. Esto es especialmente cierto en el caso de *B. pendula*, donde las peroxidasas ácidas prácticamente desaparecen.

#### II.4. Caracterización de la actividad peroxidasa

Al igual que se realizó en los callos, se usaron inhibidores selectivos para caracterizar la actividad peroxidasa del medio extracelular de las suspensiones, utilizando como sustrato la siringaldazina. Los resultados se presentan en las Tablas 3.5 y 3.6.

Como primer paso se usó un inhibidor general de metaloproteínas, la azida sódica. En este caso, una concentración de 1 mM provocó una total inhibición de la actividad enzimática, lo que permite afirmar que la enzima responsable de la actividad siringaldazina-peroxidasa es una metaloproteína, grupo dentro del cual se incluyen las peroxidasas (Pomar y cols. 2004).

**Tabla 3.5.** Efecto de los distintos inhibidores sobre la actividad peroxidasa en el medio extracelular de suspensiones de *B. pendula*.

<i>Inhibidor</i>	<i>nkat de Syr ml<sup>-1</sup></i>
Control	3,60 ± 0,26
Azida sódica 1mM	0,00 ± 0,00
Ácido ferúlico 1mM	0,00 ± 0,00
Tropolona 1mM	5,60 ± 0,18
Ferrocianuro potásico 100µM	0,00 ± 0,00
Ferricianuro potásico 1mM	2,04 ± 0,07

**Tabla 3.6.** Efecto de los distintos inhibidores sobre la actividad peroxidasa en el medio extracelular de suspensiones de *G. biloba*. nd= no determinado

<i>Inhibidor</i>	<i>nkat de Syr ml<sup>-1</sup></i>
Control	0,43 ± 0,14
Azida sódica 1mM	0,00 ± 0,00
Ácido ferúlico 1mM	0,00 ± 0,00
Tropolona 1mM	1,46 ± 0,04
Ferrocianuro potásico 100µM	0,00 ± 0,00
Ferricianuro potásico 1mM	nd

En las Tablas 3.5 y 3.6 se muestra que el ácido ferúlico 1 mM inhibe totalmente la oxidación de la siringaldazina por la proteína del medio extracelular. Como el ácido ferúlico no tiene efecto sobre las polifenoloxidasas de tipo lacasa (Sterjiades y cols. 1992, Chabanet y cols. 1994, Ranocha y cols. 1999), se puede descartar que éstas sean las responsables de la actividad siringaldazina-peroxidasa.

Como el ácido ferúlico es también un inhibidor de la actividad catecolasa de las polifenoloxidasas (Udagama-Randeniya y Savidge 1995, Richardson y cols. 1997), no se puede excluir que sean las catecolasas las responsables de la actividad siringaldazina-oxidasa, y con ese fin se estudió el efecto de la tropolona. Este compuesto no tuvo efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática. De este modo se puede descartar también que sean las catecolasas las responsables de la oxidación de la siringaldazina, volviendo a indicar con exclusividad a las peroxidases como responsables de dicho proceso.

Esta aseveración se confirmó mediante el uso de la pareja ferrocianuro potásico/ferricianuro potásico. El primero es un sustrato de la peroxidasa (Henriksen y cols. 1999) y puede actuar como inhibidor competitivo de la enzima. Por otra parte, el ferricianuro potásico es un análogo químico del anterior pero no es sustrato de la peroxidasa.

El ferrocianuro potásico inhibe completamente la actividad siringaldazina-peroxidasa en las suspensiones de *G. biloba* (Tabla 3.6). En el caso de *B. pendula* (Tabla 3.5) el ferrocianuro potásico causa una inhibición total de la actividad enzimática; mientras que el ferricianuro potásico no tiene efecto. De este modo se concluye que la enzima responsable de la actividad siringaldazina-peroxidasa del medio extracelular de suspensiones de *B. pendula* y *G. biloba* es una peroxidasa.

### III. Lignificación en cultivos celulares

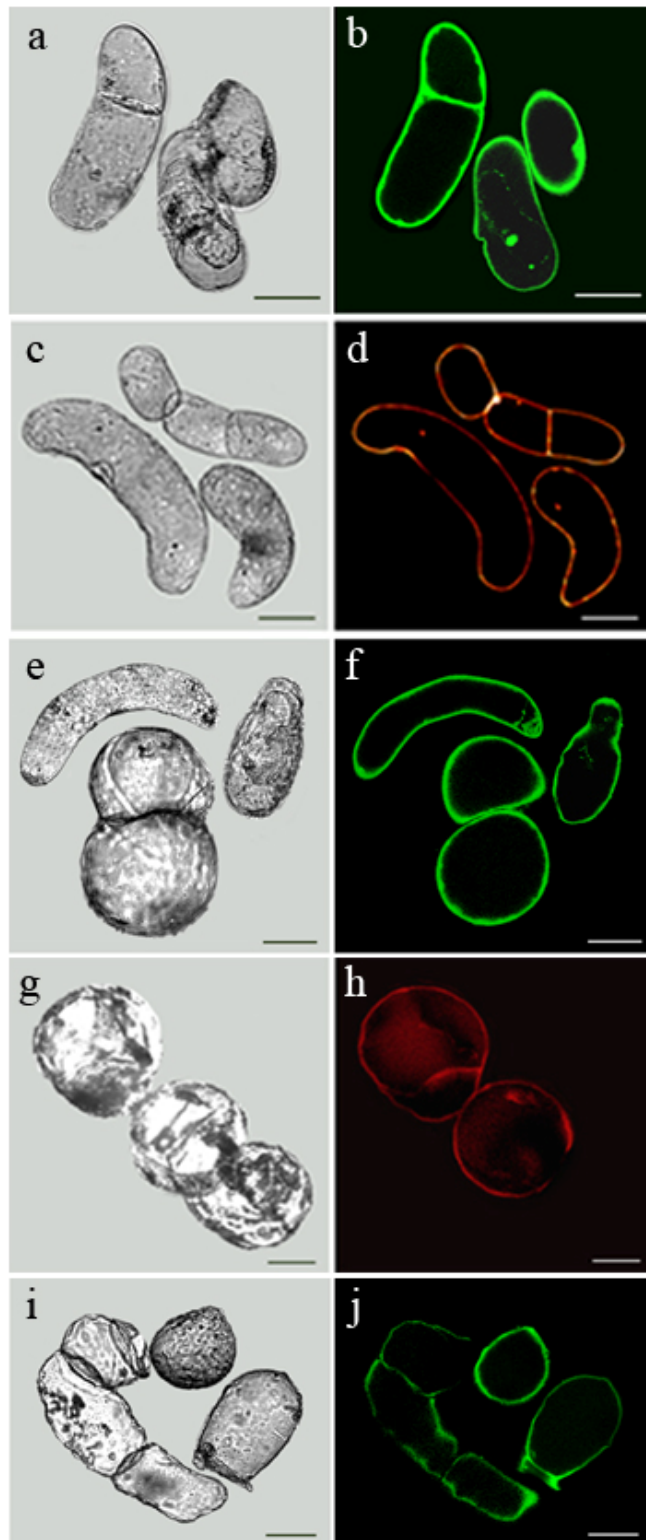
#### III.1. Localización histoquímica y citoquímica de ligninas

En los tallos de las angiospermas y las gimnospermas, el fenómeno de la lignificación se restringe al xilema, ya que las ligninas de angiospermas son ricas en coniferil y sinapilaldehído O-4-terminal, siendo dichos aldehídos las dianas de la tinción con floroglucinol (test de Wiesner) (Pomar y cols. 2002). Se utilizó este método para la determinación histoquímica de ligninas. La técnica reveló que la lignificación de los tallos de *B. pendula* se restringe precisamente al xilema, mientras que los tejidos del floema sólo presentaron una tinción débil (Figura 3.10). Además, el fenómeno de la lignificación ocurre sólo en los tejidos leñosos, mientras que los de la corteza no se tiñen (Figura 3.10).



**Figura 3.10.** Sección transversal de *B. pendula* después de teñir con floroglucinol para poner de manifiesto la presencia de ligninas. Barra 300  $\mu\text{m}$ .

Los cultivos celulares están compuestos principalmente por células indiferenciadas de manera que no presentan paredes secundarias y en muchos casos no lignifican. Sin embargo, ciertos cultivos celulares como los derivados de zinnia (Milioni y cols. 2001), picea (Kärkönen y cols. 2002) y tabaco (Blee y cols. 2001a) presentan paredes celulares secundarias, y algunos de ellos lignifican. Para comprobar si los cultivos celulares de *B. pendula*, *G. biloba* y *C. revoluta* son capaces de lignificar, células obtenidas en la fase de crecimiento estacionario se tiñeron con acriflavina y naranja de acridina. Los resultados mostraron fluorescencia verde (Figura 3.11b, f y j) y naranja (Figura 3.11d y h) a nivel de las paredes celulares primarias, y sugieren que los cultivos celulares de estas especies son capaces de lignificar.



**Figura 3.11.** Células en suspensión de *B. pendula* (a-d), *G. biloba* (e-h) y *C. revoluta* (i, j) observadas en microscopía de campo claro (a, c, e, g, i) y en microscopía láser confocal, teñidas con acriflavina (b, f, j) y naranja de acridina (d, h) con el fin de poner de manifiesto la presencia de ligninas en sus paredes celulares. Barra 20,5  $\mu\text{m}$ .

### III.2. Determinación de ligninas en suspensiones celulares de angiospermas y gimnospermas por el método del bromuro de acetilo

Una vez comprobado que estos cultivos presentan lignificación en sus paredes celulares, se procedió a la determinación del contenido de ligninas con el método del bromuro de acetilo (Iiyama y Wallis 1988) (Tabla 3.7) y se compararon los niveles de ligninas obtenidos con los encontrados en los tallos jóvenes de dichas plantas.

**Tabla 3.7.** Cuantificación de ligninas en tallos jóvenes y suspensiones celulares de *B. pendula*, *G. biloba* y *C. revoluta* con el método del bromuro de acetilo.

Especie	mg ligninas / mg pared	
	Tallos jóvenes	Suspensiones celulares
<i>B. pendula</i>	0,072±0,004	0,014±0,002
<i>G. biloba</i>	0,121±0,012	0,038±0,007
<i>C. revoluta</i>	0,057±0,001	0,015±0,003

Los resultados mostraron que la cantidad de ligninas es claramente distinta entre los tallos jóvenes y las suspensiones celulares de una misma planta, siendo mucho menos abundante en estas últimas, lo cual concuerda con el hecho de que las células en suspensión sólo presentan pared celular primaria.

Ya que el xilema constituye sólo el 15% del volumen del tallo, y es el tejido donde se acumula exclusivamente la lignina depositada en las paredes celulares, al normalizar estos datos de la tabla 3.7 respecto a la contribución de las paredes celulares del xilema, los resultados mostraron que la cantidad de ligninas es 30 veces superior en *B. pendula*, 20 veces superior en *G. biloba* y 25 veces superior en *C. revoluta*.

La mayor diferencia en la cantidad de ligninas entre las plantas de *G. biloba* y *B. pendula* puede explicarse por la diferencia en la anatomía del xilema entre gimnospermas y angiospermas. Mientras que el xilema de las gimnospermas tiene sólo traqueidas que sirven como soporte mecánico y conducto para el agua, las angiospermas tienen dos tipos de células especializadas: los elementos de los vasos, que conducen el agua, y las células de las fibras, que proveen soporte mecánico (Esau 1977). Gracias a esta separación de funciones se consigue una mayor eficiencia en las angiospermas, que se refleja en la necesidad de una menor cantidad de lignina en el xilema, lo que supone un menor gasto de carbono y energía en la optimización del proceso de la lignificación (Amthor 2003).

### III.3. Caracterización de ligninas en suspensiones celulares de angiospermas y gimnospermas mediante tioacidolisis. Relaciones H/G/S

La tioacidolisis es una técnica degradativa que rompe las ligninas por los enlaces  $\beta$ -O-4, que constituyen las uniones predominantes en éstas (Lapierre y cols. 1995), y cuya contribución puede variar entre un 50% en gimnospermas y el 80% en



angiospermas (Ralph y cols. 2004b). Por este motivo, la tioacidolisis solubiliza sólo la fracción de lignina no condensada (Anterola y Lewis 2002), localizada principalmente en las paredes celulares secundarias (Ruel y cols. 2002).

**Tabla 3.8.** Composición monomérica de las ligninas, obtenida mediante tioacidolisis de las paredes celulares, del xilema y de las suspensiones celulares.

<b>Especies</b>	<b>Relación H/G/S (%)</b>	
	<b>Xilema</b>	<b>Suspensiones celulares</b>
<i>B. pendula</i>	0/29/71	12/40/48
<i>G. biloba</i>	3/97/0	39/50/11
<i>C. revoluta</i>	0/86/14	29/71/0

Los resultados (Tabla 3.8) muestran que las ligninas del xilema de *B. pendula* contienen una alta proporción de unidades S respecto a las unidades G. Sin embargo, las unidades G son las más abundantes en las dos gimnospermas estudiadas. En *G. biloba* aparecen unidades H en una baja proporción pero no aparecen unidades S, lo que constituye el patrón típico de las gimnospermas. La ausencia de unidades S ha sido anteriormente descrita (Gómez Ros y cols. 2007c). Sin embargo, en *C. revoluta* no aparecen unidades H, pero sí una cantidad importante de unidades S.

Estas proporciones se ven modificadas de forma notable en las suspensiones celulares. Quizá el hecho más destacable sea la presencia de unidades S en suspensiones celulares de *G. biloba* frente a su ausencia en el xilema. De manera opuesta, en suspensiones celulares de *C. revoluta* no aparecen unidades S, cuando sí se observan en el xilema de la misma especie. Esta varianza podría explicarse a través de cambios en la regulación transcripcional de la lignificación, principalmente en lo que afecta a los factores de transcripción (Patzlaff y cols. 2003, Newman y cols. 2004, Rogers y cols. 2005). Así, podría ocurrir que la presencia diferencial de unidades S en las suspensiones celulares de *G. biloba* con respecto al xilema sea consecuencia de un cambio en la regulación de la transcripción, ya que las células en suspensión son indiferenciadas. En cualquier caso, lo que parece claro es que las gimnospermas poseen la capacidad de sintetizar unidades S, pero esta capacidad está latente en el xilema, caso contrario a lo que ocurre en *C. revoluta*. En todo caso estos resultados están de acuerdo con el hecho de que las peroxidases capaces de oxidar los grupos siringilo están presentes desde las especies más ancestrales hasta las especies más evolucionadas (Gómez Ros y cols. 2007c, Ros Barceló y cols. 2007). De hecho, la presencia de actividad siringil-peroxidasa en los cultivos de *G. biloba* está de acuerdo con el potencial de sintetizar unidades S por esta especie (Figura 3.8).

De estos resultados se puede también inferir que la presencia o ausencia de unidades S en las suspensiones celulares de gimnospermas no es predecible puesto que, con respecto al xilema, aumentan en *G. biloba*, mientras que disminuyen en *C. revoluta*. Por lo tanto, la síntesis de unidades S no es consecuencia del cultivo celular en sí mismo, como por ejemplo, en respuesta al estrés o a la aplicación exógena de hormonas.

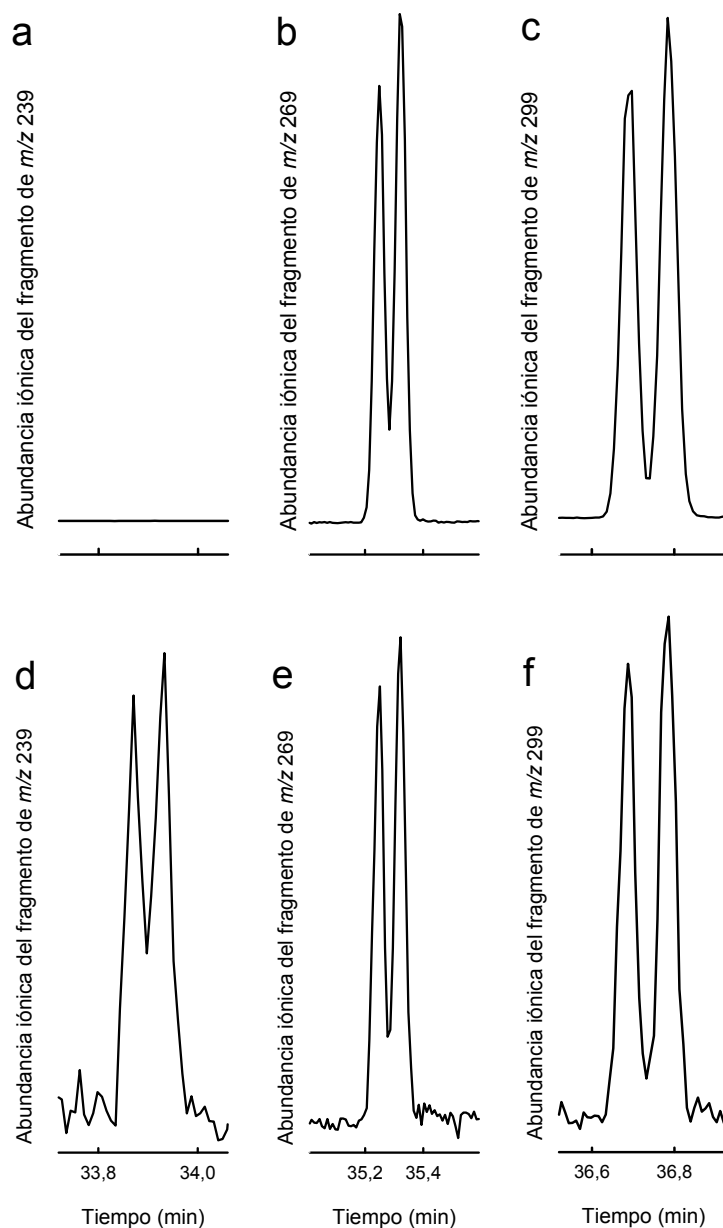
En todas las muestras analizadas la proporción de unidades H aumenta en suspensiones celulares con respecto al xilema. Se ha descrito con anterioridad (Fukuda y cols. 1988, Robert y cols. 1989, Lange y cols. 1995) que las ligninas de los cultivos celulares muestran una razón H/G mayor que las ligninas de los tejidos vasculares. Un alto contenido en unidades H es típico de las ligninas de la pared celular primaria (Fukushima y Terashima 1991) y de las ligninas formadas *de novo* en los cultivos celulares (Brunow y cols. 1993). Esto no es extraño puesto que las células en suspensión sólo presentan pared celular primaria. Por el contrario, las ligninas de la pared celular secundaria están compuestas mayoritariamente de unidades G y S, con predominancia de las uniones de tipo  $\beta$ -O-4, dando lugar a un polímero lineal (Terashima y Fukushima 1988, Chabannes y cols. 2001, Gómez Ros y cols. 2007b). Sin embargo, en los tejidos vasculares, la mayor parte de la pared celular es de tipo secundario. De hecho, los cultivos celulares que presentan pared celular secundaria muestran proporciones de unidades G/S similares a las de los tejidos vasculares, indicando que las diferencias encontradas entre las suspensiones celulares y los tejidos vasculares se deben exclusivamente a la presencia o no de pared celular secundaria (Möller y cols. 2005). Así, las suspensiones de células indiferenciadas constituyen un modelo único de estudio de la lignificación de la pared celular primaria (Christiernin y cols. 2005).

Fukushima y Terashima (1991) han descrito que en *G. biloba* las ligninas ricas en unidades H se forman en la lámina media y esquinas celulares durante las primeras fases de la lignificación. Las ligninas de tipo G son las que se depositan primero en la lámina media y luego en la pared secundaria, mientras que las ligninas de tipo S sólo se depositan en cantidades traza durante las últimas fases de la lignificación de la pared secundaria. Resultados similares han descrito Hosokawa y cols. (2001) trabajando con células del mesófilo de *Z. elegans* en diferenciación, donde el alcohol sináplico se incorpora después de que haya empezado el proceso de lignificación, justo cuando se produce la lisis completa de los elementos traqueales.

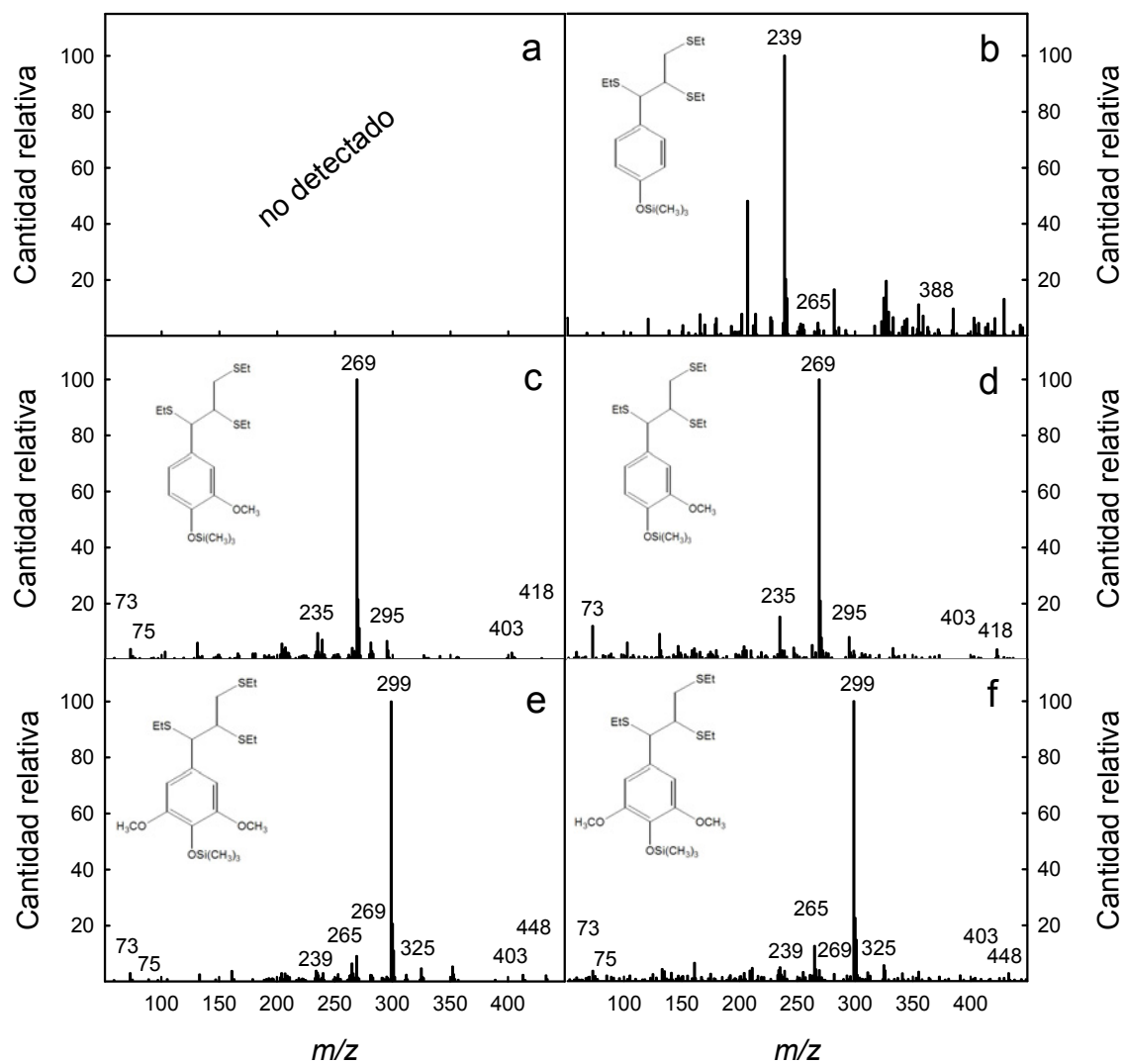
Se ha dicho con frecuencia que las ligninas se forman en tejidos que han dejado de crecer y que, por lo tanto, las ligninas no se consideran como un constituyente esencial de las paredes celulares primarias de los tejidos en crecimiento (Carpita y Gibeaut 1993, Iiyama y cols. 1993). Sin embargo, los resultados de esta tesis muestran que las ligninas no están restringidas a los tejidos vasculares, sino que son un constituyente común de las paredes celulares primarias de las células capaces de experimentar división y elongación, por lo que las células en cultivo deben de presentar mecanismos para atenuar y controlar la rigidez que confieren las ligninas a las paredes celulares primarias. Uno de estos mecanismos puede ser un control estrecho del grado de polimerización, por lo que el estudio de éste será del objeto del siguiente apartado.

### III.4. Caracterización de ligninas en suspensiones celulares de angiospermas y gimnospermas mediante tioacidolisis. Monómeros estructurales y grado de polimerización

Los principales productos revelados por tioacidolisis de las paredes celulares de las especies estudiadas fueron los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) (Figuras 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 y 3.17) que surgen de las estructuras aril-glicerol- $\beta$ -aryl éter ( $\beta$ -O-4) derivadas de las unidades H y G, típicas de las ligninas de las gimnospermas, y en algunos casos, también de las unidades S, típicas de las ligninas de las angiospermas, coexistiendo en casi todas las especies con estructuras estilbeno derivadas del alcohol coniferílico (Tablas 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14).

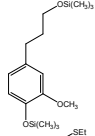
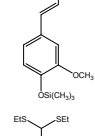
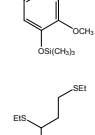
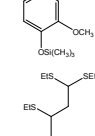
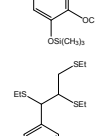
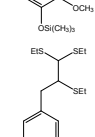
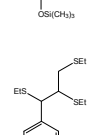
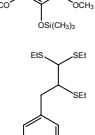
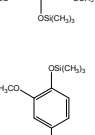
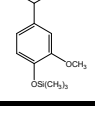


**Figura 3.12.** Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- $\beta$ -aryl éter ( $\beta$ -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(a y d), coniferílico (b y e) y sinapílico (c y f), en las ligninas del xilema (a-c) y de suspensiones celulares (d-f) de *B. pendula*.

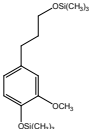

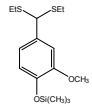
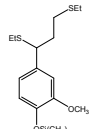
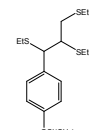
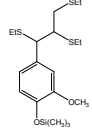
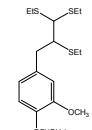
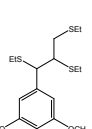
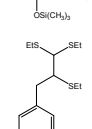
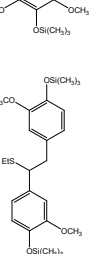


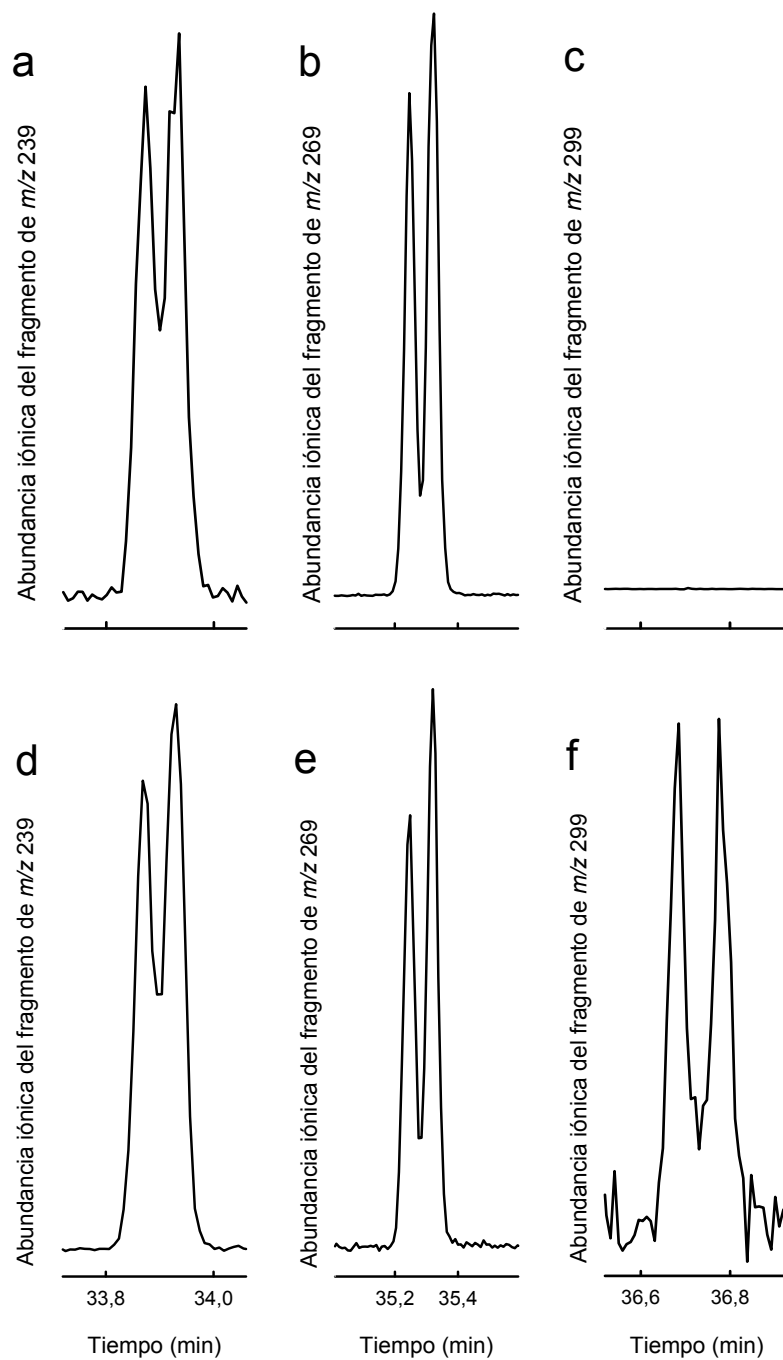
**Figura 3.13.** Espectros de masas de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- $\beta$ -aril éter ( $\beta$ -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a-b), coniferílico (c-d) y sinapílico (e-f), en las ligninas del xilema (a, c y e) y de suspensiones celulares (b, d y f) de *B. pendula*.

**Tabla 3.9.** Productos de tioacidólisis del xilema de *B. pendula*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

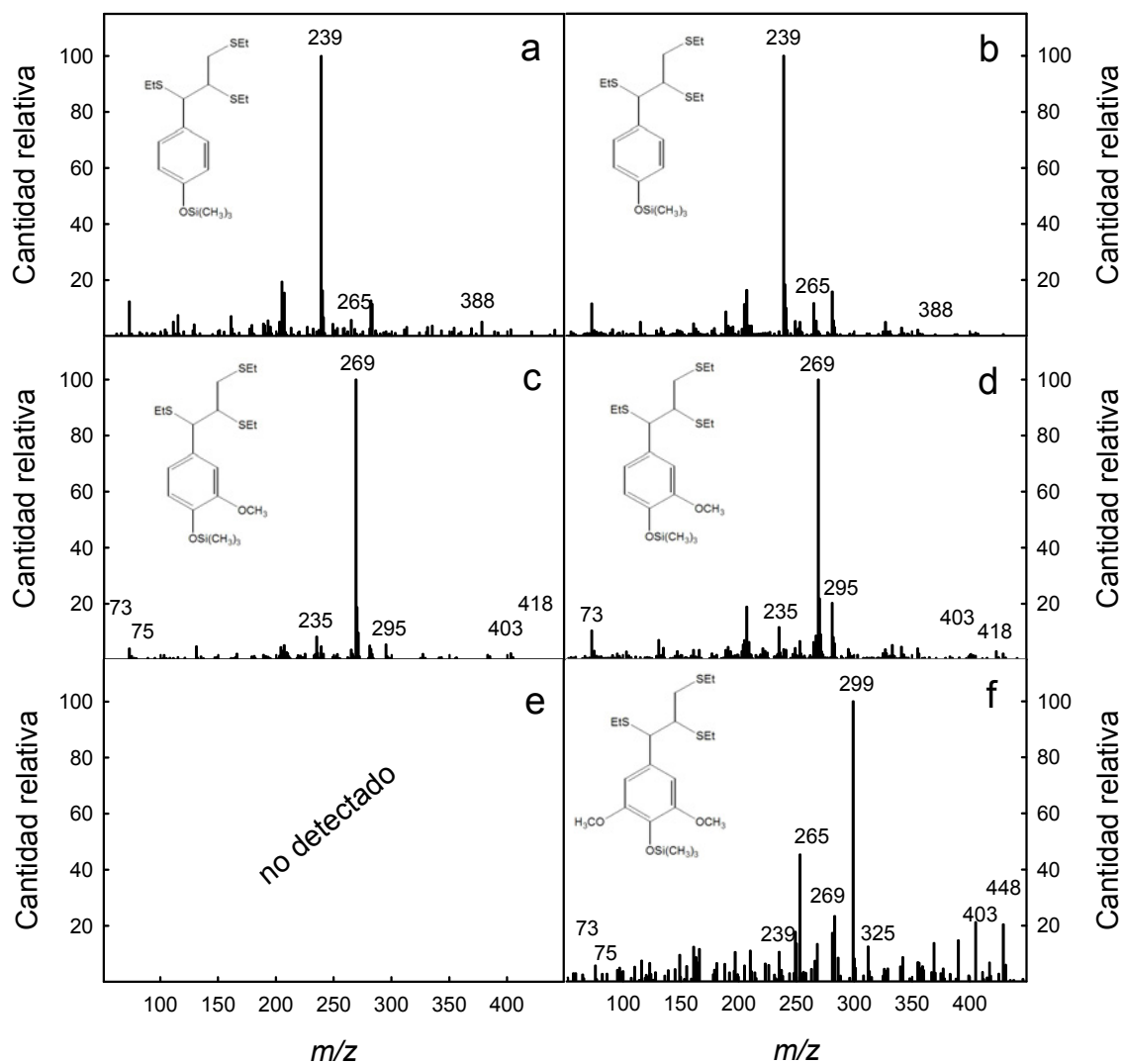
<b>Producto tioacidólisis</b>	<b>tr (min)</b>	<b>m/z (Intensidad relativa)</b>	<b>Unidad estructural en las ligninas</b>
	22,2	326(52), 311(24), 236(43), 221(47), 209(33), 206(100), 179(21), 73(86)	Alcohol dihidroconiferílico O-4-terminal
	27,3	296(12), 281(13), 235(100), 204(28), 131(44)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	27,4	330(4), 315(4), 269(100), 239(15)	Vanillina O-4-terminal
	30,1	358(10), 343(14), 297(100), 235(81), 209(44), 205(46), 75(68), 73(72)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	35,0	418(2), 356(9), 295(17), 269(100), 239(21), 209(7), 192(15)	Coniferilaldehído O-4-terminal
	35,2	418(1), 403(2), 295(7), 269(100), 235(9), 75(1), 73(4)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	35,4	418(2), 403(8), 283(94), 222(100), 192(28), 135(52), 75(14), 73(41)	Coniferilaldehído unido por enlaces β-O-4
	36,8	448(1), 403(1), 325(5), 299(100), 269(9), 265(6), 239(1), 75(1), 73(3)	Alcohol sinapílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	36,9	448(1), 433(5), 313(1), 252(100), 222(22), 135(30), 75(6), 73(17)	Sinapilaldehído unido por enlaces β-O-4
	37,9	478(1), 463(1), 417(9), 269(100), 73(30)	Unidades estilbeno derivadas del alcohol coniferílico

**Tabla 3.10.** Productos de tioacidolisis de suspensiones celulares de *B. pendula*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	22,2	326 (4), 311 (5), 236 (4), 221 (19), 209 (37), 206 (17), 179 (23), 73 (100)	Alcohol dihidroconiferílico O-4-terminal
	27,3	296 (1), 281 (1), 235 (100), 204 (4), 131 (24), 75 (65), 73 (90)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	27,4	330 (1), 315 (3), 269 (100), 239 (8)	Vanillina O-4-terminal
	30,1	358 (6), 343 (7), 297 (13), 235 (23), 209 (41), 205 (27), 75 (70), 73 (100)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	33,9	388(1),265(2), 239(100)	Alcohol p-cumarílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	35,3	418(1), 403(1), 295(8), 269(100), 235(15), 75(0), 73(12)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	35,4	418 (6), 403 (9), 283 (40), 222 (11), 192 (12), 135 (41), 75 (32), 73 (100)	Coniferilaldehído unido por enlaces β-O-4
	36,7	448(1), 403(1), 325(3), 299(100), 269(7), 265(12), 239(3), 75(1), 73 (7)	Alcohol sinapílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	36,8	433 (15), 313 (24), 252 (8), 222 (1), 135 (100), 75 (26)	Sinapilaldehído unido por enlaces β-O-4
	37,9	463 (7), 417 (9), 269 (91), 73 (100)	Unidades estilbено derivadas del alcohol coniferílico



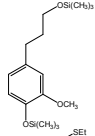
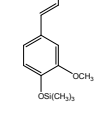
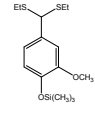
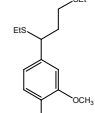
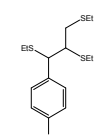
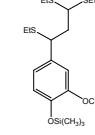
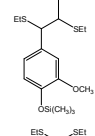
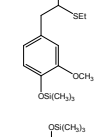
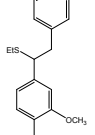
**Figura 3.14.** Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- $\beta$ -aril éter ( $\beta$ -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(a y d), coniferílico (b y e) y sinapílico (c y f), en las ligninas del xilema (a-c) y de suspensiones celulares (d-f) de *G. biloba*.



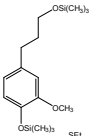
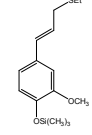
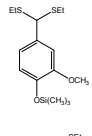
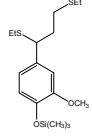
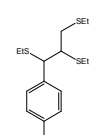
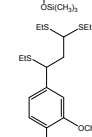
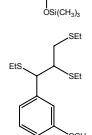
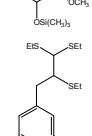
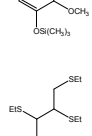
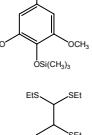
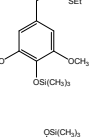
**Figura 3.15.** Espectros de masas de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- $\beta$ -aril éter ( $\beta$ -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a-b), coniferílico (c-d) y sinapílico (e-f), en las ligninas del xilema (a, c y e) y de suspensiones celulares (b, d y f) de *G. biloba*.

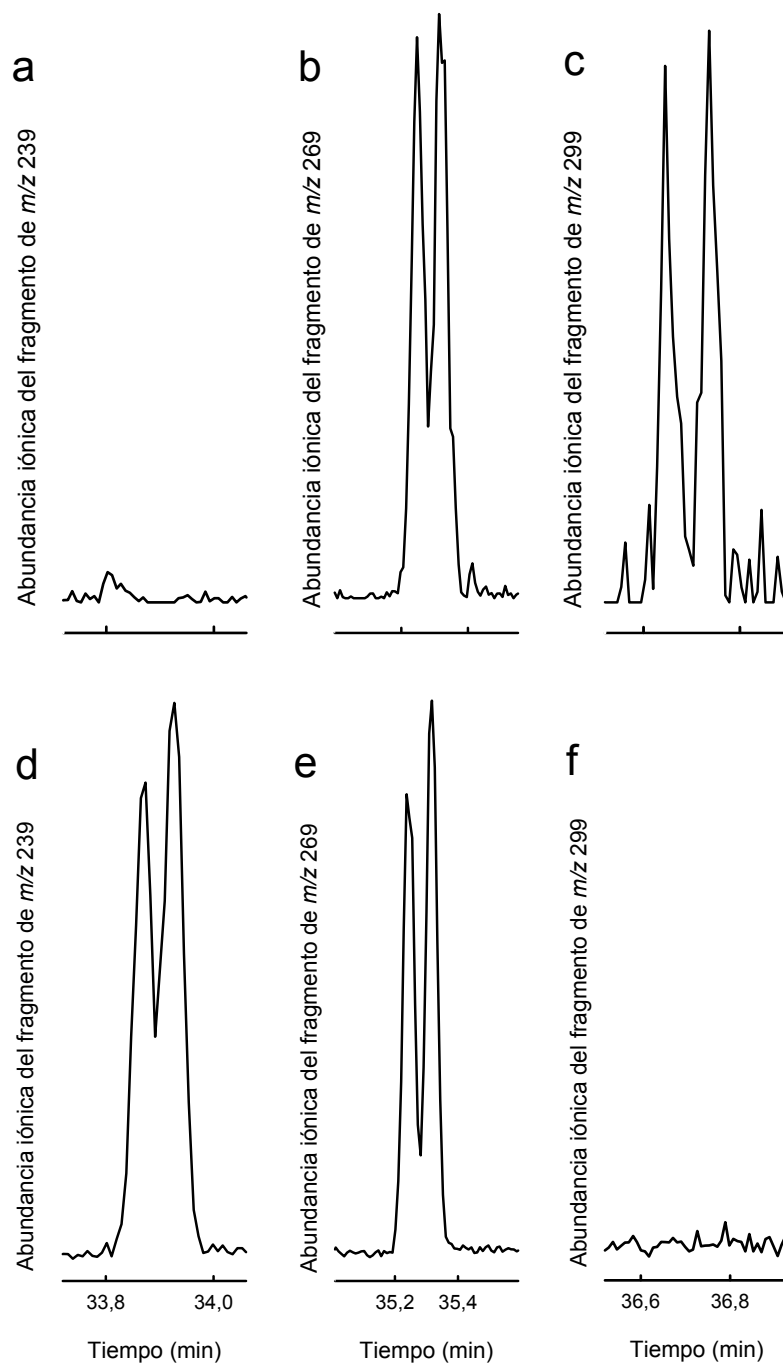


**Tabla 3.11.** Productos de tioacidolisis del xilema de *G. biloba*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

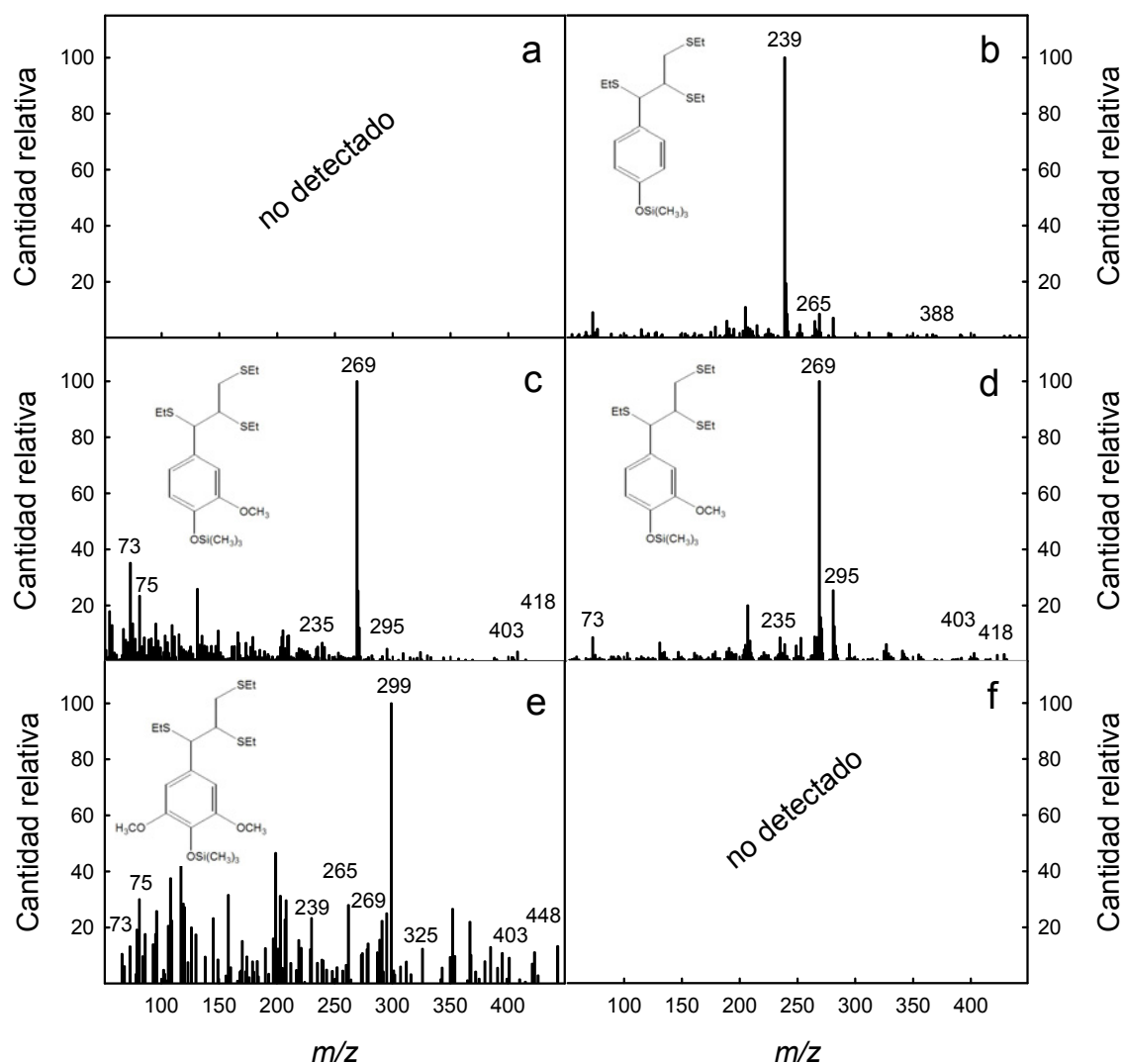
Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	22,2	326 (42), 311 (11), 236 (43), 221 (55), 209 (38), 206 (87), 179 (18), 73 (100)	Alcohol dihidroconiferílico O-4-terminal
	27,3	296 (17), 281 (20), 235 (100), 204 (38), 131 (49), 73 (6)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	27,4	330 (1), 315 (5), 269 (100), 239 (10), 73 (15)	Vanillina O-4-terminal
	30,6	358 (11), 343 (12), 297 (100), 235 (63), 209 (23), 205 (24), 75 (36), 73 (34)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	33,9	388 (1), 265(6), 239 (100), 205 (19), 75 (1), 73 (12)	Alcohol p-cumarílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	35,0	403 (3), 356(20), 327(17), 295 (29), 269 (100), 239 (8), 209 (18), 192 (7), 135(4), 73(13)	Coniferilaldehído O-4-terminal
	35,3	418(1), 403(2), 295(7), 269(100), 235(10), 75(2), 73(4)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	35,4	418 (3), 403 (21), 283 (100), 222 (59), 192 (26), 135 (53), 75 (16), 73 (68)	Coniferilaldehído unido por enlaces β-O-4
	37,9	478 (1), 463 (1), 417 (5), 269 (100), 73 (21)	Unidades estilbena derivadas del alcohol coniferílico

**Tabla 3.12.** Productos de tioacidolisis de suspensiones celulares de *G. biloba*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	22,2	326 (2), 311 (1), 236 (3), 221 (15), 209 (40), 206 (9), 179 (13), 73 (100)	Alcohol dihidroconiferílico O-4-terminal
	27,3	296 (8), 281 (50), 235 (100), 204 (41)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	27,4	315 (4), 269 (100), 239 (11), 73 (21)	Vanillina O-4-terminal
	30,6	358 (4), 343 (8), 297 (32), 235 (32), 209 (38), 205 (24), 75 (52), 73 (100)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	34,0	388(1),265(12), 239(100), 205(11), 75(2), 73(12)	Alcohol p-cumarílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	34,9	418(1), 403(2), 356(16), 327(39), 295(12), 269(100), 239(6), 73(10)	Coniferilaldehído O-4-terminal
	35,3	418(1), 403(2), 295(4), 269(100), 235(12), 75(3), 73(10)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	35,4	418 (3), 403 (8), 283 (30), 222 (7), 192 (24), 135 (31), 75 (19), 73 (100)	Coniferilaldehído unido por enlaces β-O-4
	36,8	448(2), 299(100), 265(7), 75(13)	Alcohol sinapílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	36,9	448 (6), 313 (12), 252 (14), 222 (12), 135 (39), 75 (23), 73 (100)	Sinapilaldehído unido por enlaces β-O-4
	37,9	478 (5), 463 (6), 417 (5), 269 (100), 73 (95)	Unidades estilbeno derivadas del alcohol coniferílico

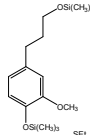
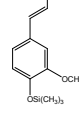
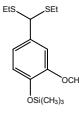
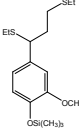
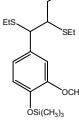
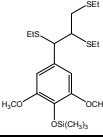


**Figura 3.16.** Perfiles de la cromatografía de gases de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- $\beta$ -aril éter ( $\beta$ -O-4), derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico(a y d), coniferílico (b y e) y sinapílico (c y f), en las ligninas del xilema (a-c) y de suspensiones celulares (d-f) de *C. revoluta*.

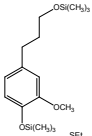
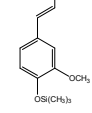

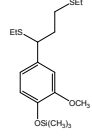
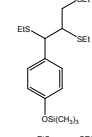
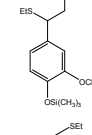
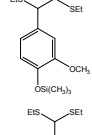
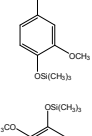
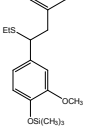


**Figura 3.17.** Espectros de masas de los monómeros tioetilados (isómeros *eritro* y *treo*) que surgen de las estructuras aril-glicerol- $\beta$ -aril éter ( $\beta$ -O-4) derivadas de los alcoholes *p*-cumarílico (a-b), coniferílico (c-d) y sinapílico (e-f), en las ligninas del xilema (a, c y e) y de suspensiones celulares (b, d y f) de *C. revoluta*.

**Tabla 3.13.** Productos de tioacidólisis del xilema de *C. revoluta*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

<b>Producto tioacidólisis</b>	<b>tr (min)</b>	<b>m/z (Intensidad relativa)</b>	<b>Unidad estructural en las ligninas</b>
	20,5	326 (12), 311 (7), 236 (22), 221 (34), 209(1), 206 (59), 179 (23), 73 (100)	Alcohol dihidroconiferílico O-4-terminal
	25,6	296 (0), 281 (0), 235 (7), 204 (7), 131 (14), 75 (33), 73 (100)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	25,7	330 (0), 315 (1), 269 (100), 239 (36), 73 (90)	Vanillina O-4-terminal
	28,8	358 (0), 343 (1), 297 (28), 235 (19), 209 (5), 205 (4), 75 (100), 73 (91)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	33,5	403(2), 295(5), 269(100), 235(5), 75(14), 73(35)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 ( <i>eritro</i> y <i>treo</i> )
	34,9	448 (0), 403 (1), 325 (0), 299(100), 269 (5), 265 (7), 239 (15), 75 (13), 73 (40)	Alcohol sinapílico unido por enlaces β-O-4 ( <i>eritro</i> y <i>treo</i> )

**Tabla 3.14.** Productos de tioacidolisis de suspensiones celulares de *C. revoluta*, tiempos de retención en la cromatografía de gases, patrones de fragmentación, y unidad estructural en las ligninas de los que son derivados.

Producto tioacidolisis	tr (min)	m/z (Intensidad relativa)	Unidad estructural en las ligninas
	22,2	326 (17), 311 (1), 236 (13), 221 (25), 209 (86), 206 (18), 179 (39), 73 (100)	Alcohol dihidroconiferílico O-4-terminal
	27,3	296 (4), 281 (50), 235 (34), 204 (14), 131 (25), 75 (45), 73 (100)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	27,4	330 (1), 315 (8), 269 (100), 239 (15), 73 (84)	Vanillina O-4-terminal
	30,6	358 (3), 343 (6), 297 (31), 235 (24), 209 (28), 205 (19), 75 (63), 73 (100)	Alcohol coniferílico O-4-terminal
	33,9	388(1), 265(8), 239(100), 205(18), 75(1), 73(3)	Alcohol p-cumarílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	34,9	418(1), 403(9), 356(40), 327(46), 269(100), 239(1), 209(14), 192(10), 135(6)	Coniferilaldehído O-4-terminal
	35,2	418(1), 403(5), 295(8), 269(100), 235(12), 75(4), 73(10)	Alcohol coniferílico unido por enlaces β-O-4 (eritro y treo)
	35,4	418 (3), 403 (16), 283 (55), 222 (11), 192 (24), 135 (42), 75 (23), 73 (100)	Coniferilaldehído unido por enlaces β-O-4
	37,9	463 (5), 417 (11), 269 (100), 73 (18)	Unidades estilbena derivadas del alcohol coniferílico

**Tabla 3.15.** Productos de degradación obtenidos por tioacidolisis de las paredes celulares de las especies vegetales estudiadas. Los valores se dan en corriente ionica total (TIC) x 10<sup>-8</sup> mg<sup>-1</sup> pared celular. Est: estructuras estilbeno; CAIc: alcohol coniferílico; CAId: coniferilaldehído; SAIc: alcohol sinapílico; SAId: sinapilaldehído; CmAlc: alcohol *p*-cumarílico; DHCA: alcohol dihidroconiferílico; V: vanillina, Tr: cantidades traza. La desviación estándar de los valores se encuentra dentro del 5% del valor de la media.

Muestra	Origen	$\beta$ -O-4					Est	O-4-terminal			
		CAIc	CAId	SAIc	SAId	CmAlc		CAIc	CAId	DHCA	V
<i>B. pendula</i>	Tallo	113,4	11,0	272,4	14,8	-	7,0	7,8	4,8	2,2	0,4
	Suspension celular	3,4	1,3	4,2	Tr	1,0	0,4	3,0	-	0,6	0,6
<i>G. biloba</i>	Tallo	89,8	0,8	-	-	3,2	4,6	5,6	2,4	1,2	1,2
	Suspension celular	10,6	2,1	2,2	0,2	8,1	Tr	1,3	1,0	0,1	1,2
<i>C. revoluta</i>	Tallo	94,0	-	16,0	-	-	-	9,2	-	0,1	4,0
	Suspension celular	8,5	0,6	-	-	3,4	Tr	1,6	0,7	Tr	0,1

Los análisis de tioacidolisis también mostraron que los monómeros unidos por enlaces aril-glicerol- $\beta$ -aril éter, derivados del alcohol coniferílico y coniferilaldehído, están presentes en casi todas las muestras, excepto en el xilema de *C. revoluta*, que no presenta coniferilaldehído (Tabla 3.15). Los monómeros unidos por enlaces  $\beta$ -O-4 derivados tanto del alcohol sinapílico como del sinapilaldehído están presentes en la única angiosperma estudiada tanto en el xilema como en las suspensiones celulares. Sin embargo, en el caso de este monolignol y de su aldehído no se observa un patrón claro en las gimnospermas, ya que sus productos de tioacidolisis aparecen en suspensiones celulares de *G. biloba*, pero no en las suspensiones celulares de *C. revoluta*; por el contrario, estos productos aparecen en el xilema de *C. revoluta* pero no en el xilema de *G. biloba*. En cuanto a los monómeros derivados del alcohol *p*-cumarílico, éstos aparecen en todas las muestras analizadas excepto en el xilema de *B. pendula* y *C. revoluta*.

Cuando se compara la cantidad de monómeros obtenidos por tioacidolisis en los tallos y en las suspensiones celulares, el nivel de éstos fue mucho mayor en los tallos, hecho que sugiere que sus ligninas son mucho menos condensadas. Estos resultados están de acuerdo con los descritos previamente por Lange y cols. (1995) y Christiernin y cols. (2005).

En ninguna de las muestras ensayadas se encontró ácido ferúlico o ácido *p*-cumárico, hecho que está de acuerdo con lo observado por Lange y cols. (1995) en suspensiones de *Picea abies*. Estos datos se han descrito en paredes celulares primarias de gimnospermas (Carnachan y Harris 2000) y sus ésteres polisacáridicos se han descrito como centros de nucleación de la lignificación (Ralph y cols. 1995).

Los análisis de tioacidolisis también revelaron cantidades importantes de unidades O-4-terminales (Tabla 3.15), principalmente aquellas derivadas del alcohol coniferílico, del coniferilaldehído y de la vanillina (Tabla 3.15), las cuales están presentes en todas las muestras estudiadas, exceptuando las derivadas del coniferilaldehído, que están ausentes en suspensiones celulares de *B. pendula* y en tallos de *C. revoluta*. Junto a ellas, se observó la presencia de la unidad O-4-terminal derivada del alcohol dihidroconiferílico (DHCA) (Tabla 3.15), un monómero típico de las ligninas de las gimnospermas (Lapierre y cols. 1995, Gómez-Ros y cols. 2007c)

que, sin embargo, también está presente en la única angiosperma estudiada (Tabla 3.15). El DHCA es también un componente de las ligninas de la solanácea *Capsicum annuum* (Gómez-Ros y cols. 2007b).

Con la excepción de la vanillina, que puede surgir del coniferilaldehído mediante una reacción de tipo aldol en la pared celular (Kim y cols. 2002), el resto de las unidades O-4-terminales presentes en esta fracción de las ligninas merecen una atención especial. La mayoría de estas estructuras son centros de nucleación (iniciación) del crecimiento de las ligninas, ya que éstas sólo pueden surgir del acoplamiento de un radical  $\beta$  de un monolignol con el radical 4-O de una unidad terminal (Durbeej y Eriksson 2003). En otras palabras, estas unidades O-4-terminales actúan como centros de nucleación a los cuales los radicales  $\beta$  de los monolignoles se añaden en pasos sucesivos, permitiendo así a la red de ligninas crecer por adiciones sucesivas de los radicales  $\beta$  (Durbeej y Eriksson 2003). Sin embargo, el crecimiento lineal del polímero de lignina no es infinito ya que los sitios para la adición de los radicales  $\beta$  de los monolignoles pueden llegar a saturarse (Gabaldón y cols. 2006).

De acuerdo con este razonamiento, se puede esperar que la razón de monómeros unidos por enlaces  $\beta$ -O-4/monómeros O-4-terminales ( $\Sigma \beta$ -O-4/ $\Sigma$  O-4) refleje aproximadamente el grado de polimerización de la fracción lineal ( $\beta$ -O-4) de las ligninas. Así, las ligninas de las suspensiones celulares están más ramificadas que las correspondientes del xilema, puesto que la razón anterior es menor en el caso de las suspensiones celulares (Tabla 3.16), ya que el número de monómeros 4-O-terminales pueden ser indicativos del número de cadenas. Similares conclusiones fueron alcanzadas por Christiernin y cols. (2005), y concuerdan con la idea de que las suspensiones celulares poseen paredes celulares primarias donde los monómeros de ligninas se unen fundamentalmente mediante enlaces C-C (Lai y Sarkanen 1975); mientras que en las paredes celulares del xilema predominan los enlaces lineales  $\beta$ -O-4 (Terashima y Fukushima 1988, Chabannes y cols. 2001).

**Tabla 3.16.** Relaciones entre el tipo y la razón de los monómeros, así como razones entre los distintos tipos de enlaces presentes en las ligninas del xilema y de los cultivos celulares.

Muestra	Origen	DHCA	S/G	$\Sigma\beta$ -O-4	$\Sigma$ O-4	$\Sigma\beta$ -O-4/ $\Sigma$ O-4
<i>B. pendula</i>	Tallo	2,2	2,4	411,6	15,2	27,1
	Suspensión celular	0,6	1,2	9,9	4,2	2,4
<i>G. biloba</i>	Tallo	1,2	-	93,8	10,4	9,0
	Suspensión celular	0,1	0,2	23,2	3,6	6,4
<i>C. revoluta</i>	Tallo	0,1	<0,1	110,0	13,3	8,3
	Suspensión celular	Tr	-	12,5	2,4	5,2

Las relaciones descritas en la tabla 3.16 confirman los resultados obtenidos mediante la cuantificación de ligninas por el método del bromuro de acetilo (Tabla 3.8),



que sugerían la existencia de una mayor cantidad de ligninas en los tallos que en las de suspensiones celulares. Sin embargo, no se mantienen las relaciones entre las muestras, y este hecho puede deberse a que el bromuro de acetilo solubiliza las ligninas a través de la rotura de los enlaces  $\alpha$ -éter, mientras que la principal diana de la tioacidolisis son los enlaces  $\beta$ -O-4.

Se ha descrito recientemente (Gómez-Ros y cols. 2007b) que la razón de monómeros unidos por enlaces  $\beta$ -O-4/monómeros 4-O-terminales aumenta cuando lo hace la proporción de unidades S, en el caso de ligninas con una preponderancia de unidades S. En el caso de las ligninas de gimnospermas la relación  $\Sigma \beta$ -O-4/ $\Sigma$  O-4 decae exponencialmente con el contenido en DHCA. Estos resultados sugieren un control puramente químico del grado de polimerización de la fracción lineal de las ligninas.

### III.5. Caracterización de la composición monomérica de las ligninas mediante oxidación con nitrobeneno

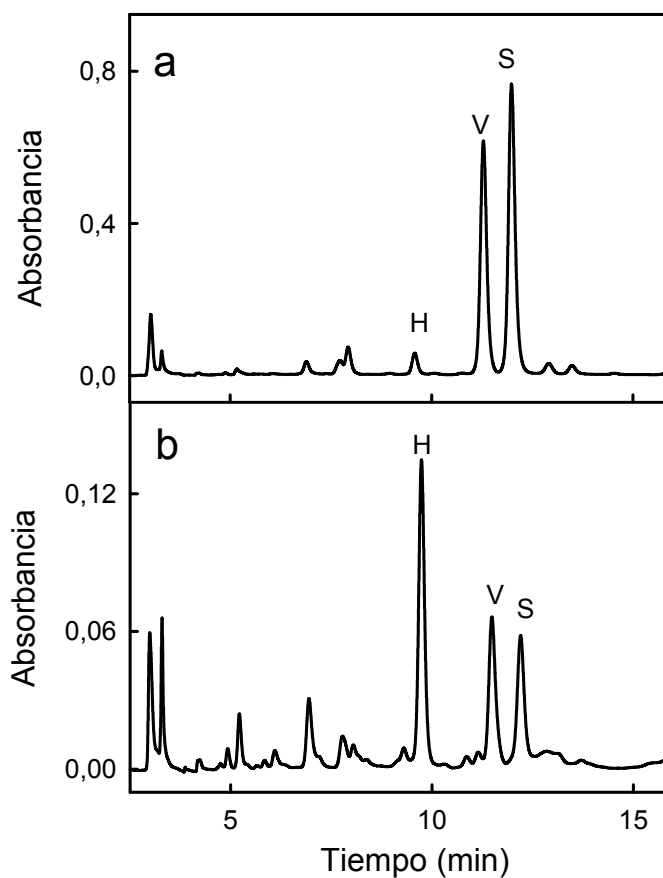
La oxidación con nitrobeneno es una técnica degradativa que sirve para obtener información acerca de la composición original de las ligninas. Esta técnica solubiliza tanto las fracciones condensada como no condensada presentes en las paredes primarias y secundarias (Anterola y Lewis 2002). En el caso de la oxidación con nitrobeneno las tres unidades de las ligninas, *p*-hidroxifenilo, guaiacilo y siringilo, producen los correspondientes *p*-hidroxibenzaldehído, vanillina y siringaldehído (Figuras 3.18, 3.19 y 3.20), respectivamente.

**Tabla 3.17.** Composición monomérica de las ligninas del xilema y de las suspensiones celulares obtenida mediante oxidación con nitrobeneno. <sup>a</sup> Resultados tomados de Gross 1980.

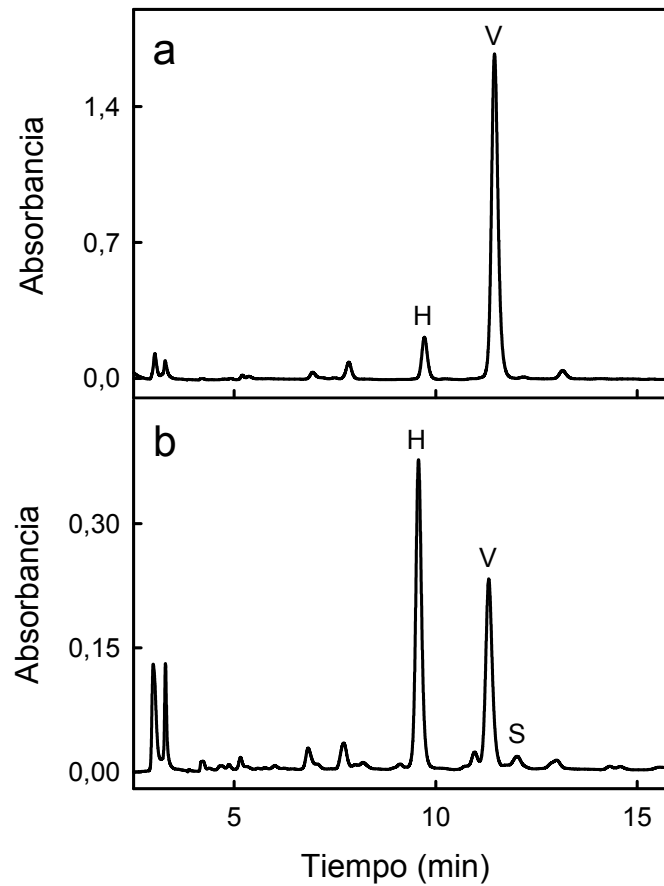
<i>Especies</i>	<i>Relación H/G/S (%)</i>	
	<i>Xilema</i>	<i>Suspensiones</i>
<i>B. pendula</i>	1/41/58	7/28/65
<i>G. biloba</i>	7/93/0	38/58/4
<i>C. revoluta</i>	1/98/1 a	29/71/0

Los resultados (Tabla 3.17) muestran que el xilema de *B. pendula*, presenta una proporción semejante de unidades G y S, con una mínima proporción de unidades H. En las dos gimnospermas estudiadas la unidad mayoritaria es la unidad G, en un porcentaje superior al 90% y una cierta proporción de unidades H. El xilema de *G. biloba* presenta unidades S, mientras que en el xilema de *C. revoluta* las unidades S constituyen un 1% del total de los monómeros. Las diferencias más notables se presentan en las suspensiones celulares, donde la proporción de unidades H aumenta siempre en relación a la proporción presente en el xilema, particularmente en el caso de las dos gimnospermas estudiadas. Además, tanto en *B. pendula* como en *G. biloba* la proporción de unidades S aumenta en relación con la presente en el xilema. En el

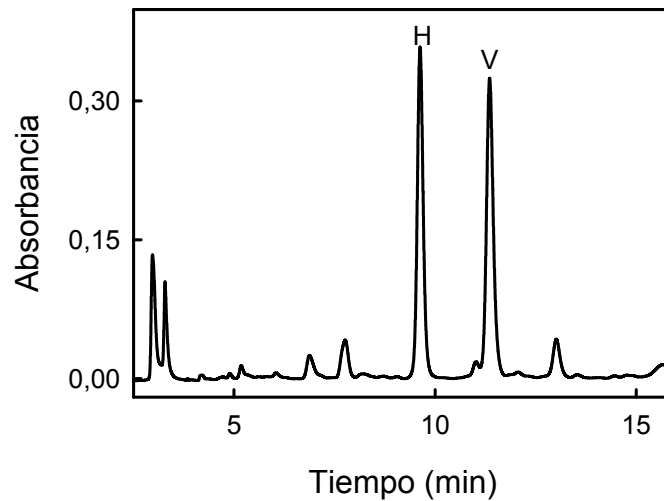
caso de *C. revoluta*, la proporción de unidades S disminuye desde el 1% a estar ausente en las suspensiones celulares.



**Figura 3.18.** Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzeno obtenidos de las paredes celulares de *B. pendula*, tanto del xilema (a) como de suspensiones celulares (b), mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H), vanillina (V) y siringaldehído (S).



**Figura 3.19.** Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzenceno obtenidos de las paredes celulares de *G. biloba*, tanto del xilema (a) como de suspensiones celulares (b), mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H), vanillina (V) y siringaldehído (S).



**Figura 3.20.** Perfil de HPLC de los productos de la oxidación alcalina con nitrobenzenceno obtenidos de las paredes celulares de suspensiones celulares de *C. revoluta*, mostrando la presencia de *p*-hidroxibenzaldehído (H) y vanillina (V).

Cuando se compararon los resultados obtenidos mediante la oxidación con nitrobenzono con los resultados obtenidos mediante la tioacidolisis (Tabla 3.20) se observó una cierta similaridad, pero también claras tendencias: la proporción de unidades S obtenida por tioacidolisis generalmente es mayor que la obtenida mediante la oxidación con nitrobenzono, mientras que la proporción de unidades H es generalmente mayor mediante la oxidación con nitrobenzono. Estas tendencias son claramente explicables ya que las unidades H se incorporan fundamentalmente en la fracción de lignina condensada depositada en las paredes celulares primarias (Terashima y Fukushima 1988), la cual no es susceptible a la tioacidolisis (Lapierre y cols. 1995), mientras que las unidades S se incorporan fundamentalmente en la fracción de lignina lineal, cuyos monómeros se encuentran unidos por enlaces  $\beta$ -O-4.

**Tabla 3.20.** Composición monomérica de las ligninas obtenida mediante oxidación con nitrobenzono (NBO) y tioacidolisis de las paredes celulares del xilema y de las suspensiones celulares. <sup>a</sup> Resultados tomados de Gross 1980.

<i>Especie</i>	<i>Relación H/G/S (%)</i>			
	<i>Xilema</i>		<i>Suspensiones celulares</i>	
	NBO	Tioacidolisis	NBO	Tioacidolisis
<i>B. pendula</i>	1/41/58	0/29/71	7/28/65	12/40/48
<i>G. biloba</i>	7/93/0	3/97/0	38/58/4	39/50/11
<i>C. revoluta</i>	1/98/1 a	0/86/14	29/71/0	29/71/0

#### IV. Enzimas implicadas en la oxidación de monolignoles y en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentes en el proteoma extracelular de suspensiones celulares de angiospermas y gimnospermas

La pared celular vegetal es una estructura dinámica que representa la barrera más externa de la célula, aportando tanto soporte estructural como control en los fenómenos de crecimiento y elongación celular. Además, supone una barrera defensiva contra el ataque de patógenos. Actualmente, la identidad de la mayor parte de las proteínas que participan en estos procesos todavía se desconoce.

Los estudios del proteoma de la pared celular son complicados debido a que existen diferencias tanto entre los distintos tejidos como entre los distintos órganos de una misma especie, y también depende del estado de desarrollo y la edad de los mismos (McCartney y cols. 2000, Shen y cols. 2003). Por ejemplo, tan sólo el 30% de las proteínas de la pared celular de hipocotilos de *Arabidopsis* coincide con las rosetas de la misma especie (Jamet y cols. 2006). Para evitar estos problemas se pueden usar suspensiones celulares, ya que estas células se encuentran en un mismo estado de desarrollo, son más homogéneas y se consigue menor contaminación intracelular. Precisamente por esta variabilidad de la pared celular de distintos órganos, los resultados obtenidos de una suspensión celular hay que tomarlos con precaución a la hora de extrapolarlos al sistema de una planta intacta. De las 132 proteínas identificadas en rosetas de *Arabidopsis*, tan sólo 17 eran comunes también a las suspensiones celulares (Boudart y cols. 2005).

Aún así, se han utilizado frecuentemente las suspensiones celulares para el estudio del proteoma de la pared celular (Robertson y cols. 1997, Blee y cols. 2001a, Borderies y cols. 2003, Ndimba y cols. 2003, Slabas y cols. 2004, Kwon y cols. 2005, Jamet y cols. 2006). Después de demostrar que los cultivos celulares de *C. revoluta*, *G. biloba* y *B. pendula* manifiestan lignificación (Figura 3.11), cabe por lo tanto esperar que secreten al medio proteínas relacionadas con la biosíntesis de ligninas.

Para estudiar el proteoma de una especie vegetal se pueden separar las proteínas mediante SDS-PAGE o electroforesis bidimensional, recortar los bandas/puntos y obtener los extremos N-terminales, o bien digerir las proteínas con tripsina. Debido al hecho de que en algunas proteínas el extremo N-terminal puede estar bloqueado y no dar ningún resultado, la estrategia que nosotros adoptamos fue la de digerir la proteína extracelular directamente con tripsina, y los diferentes fragmentos trípticos fueron separados por HPLC. Cada fragmento tríptico se identificó mediante espectrometría de masas ESI MS/MS, y se realizó una búsqueda para cada uno de los espectros obtenidos utilizando el programa Mascot. Algunos de los péptidos no identificados en el Mascot se sometieron a secuenciación manual. Esta secuenciación manual produjo determinadas secuencias de aminoácidos, y las posibles homologías con las secuencias registradas en las bases de datos se analizaron mediante el programa BLAST. Los resultados obtenidos del análisis del proteoma de la pared celular de suspensiones celulares de gimnospermas y angiospermas se muestran en las tablas 3.20, 3.21 y 3.22.

**Tabla 3.20.** Secuencias de fragmentos trípticos aislados del proteoma extracelular de cultivos celulares de *B. pendula*. Los aminoácidos destacados en negrita muestran coincidencia con los pertenecientes a proteínas de la base de datos. El porcentaje de coincidencia entre el fragmento tríptico y el detectado en la base de datos se halló en el MPsrch del EBI, y engloba los aminoácidos conservados y semiconservados.

<i>Fragmento tríptico</i>	<i>Secuencia detectada en la base de datos</i>	<i>Nº acceso</i>	<i>Proteína</i>	<i>Coincidencia (%)</i>
<i>Enzimas implicadas en la oxidación de monolignoles</i>				
<b>GLTQKDLVALSGAHTIGKAR</b>	<b><u>GLTQKDLVALSGAHTIGKAR</u></b>	AAV31745	Peroxidasa 1 ( <i>Picea abies</i> )	100
<b>GFDVIDTIK</b>	<b><u>GFDVIDTIK</u></b>	AAB02554	Peroxidasa catiónica ( <i>Stylosanthes humilis</i> )	100
<b>VVSCADILAVAAR</b>	<b><u>VVSCADILAVAAR</u></b>	CAD67478	Peroxidasa ( <i>Asparagus officinalis</i> )	100
<b>NLAPLDLQTPTAFDNNYYK</b>	<b><u>NLAPLDLQTPTAFDNNYYK</u></b>	CAD67478	Peroxidasa ( <i>A. officinalis</i> )	100
<b>FYDTTCPK</b>	<b><u>FYDTTCPT</u></b>	CAI54301	Peroxidasa ( <i>Zinnia elegans</i> )	89,9
<b>VA[L/I]GGC[L/I]PTV[Q/K][L/I]GR</b>	<b><u>VAVGGPSWTVRLGR</u></b>	CAI54301	Peroxidasa ( <i>Z. elegans</i> )	
<i>Enzimas implicadas en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>				
<b>ILGLNTLGVSLAR</b>	<b><u>ILGLNTLGVSLAR</u></b>	ABE87913	Cupina ( <i>Medicago truncatula</i> )	100
<b>AF[Q/K][L/I]DTN[L/I]VES[L/I] [Q/K]K</b>	<b><u>AFQLDVNIVEDLEAK</u></b>	NP568562	Germina 6 ( <i>A. thaliana</i> )	77,5
<b>[F/M]SG[L/I]GS[Q/K]NPG[L/I] [L/I]V[L/I]AK</b>	<b><u>FAGLGSQNPGTITIAAD</u></b>	AAF26097	Germina ( <i>A. thaliana</i> )	73,5
<b>D[F/M][F/M][F/M][Q/K]G[L/I]NTPR</b>	<b><u>DFFFSGLNVPD</u></b>	AAB51570	Germina ( <i>A. thaliana</i> )	71,2

**Tabla 3.21.** Secuencias de fragmentos trípticos aislados del proteoma extracelular de cultivos celulares de *G. biloba*. Los aminoácidos destacados en negrita muestran coincidencia con los pertenecientes a proteínas de la base de datos. El porcentaje de coincidencia entre el fragmento tríptico y el detectado en la base de datos se halló en el MPsrch del EBI, y engloba los aminoácidos conservados y semiconservados.

<b>Fragmento tríptico</b>	<b>Secuencia detectada en la base de datos</b>	<b>Nº acceso</b>	<b>Proteína</b>	<b>Coincidencia (%)</b>
<i>Enzimas implicadas en la oxidación de monolignoles</i>				
<b>GFDVIDNIK</b>	<b><u>GFDVIDNIK</u></b>	Q2RBG5	Peroxidasa catiónica 1 ( <i>O. sativa</i> )	100
<b>DMVALSGSHTIGQAR</b>	<b><u>DMVALSGSHTIGQAR</u></b>	ABA91159	Peroxidasa 52 ( <i>O. sativa</i> )	100
G[L/I]S[L/I]S[F/Mox]APK	<b><u>LNLIMTPK</u></b>	Q84SA8	Lacasa ( <i>Aster tripolium</i> )	
<i>Enzimas implicadas en el metabolismo de polisacáridos de la pared celular</i>				
<b>AVGNEV[F/Mox]ANR</b>	<b><u>AVGNEVYANK</u></b>	Q5RZ68	Glucanasa ( <i>Thuja occidentalis</i> )	83,5
<i>Otras</i>				
<b>GPLQLSWNYNYGAAGK</b>	<b><u>GPLQLSWNYNYGAAGK</u></b>	AAQ17048	Quitinasa clase IV ( <i>Picea abies</i> )	100
<b>GDAAA[Q/K]PEK</b>	<b><u>GDAAAQPGK</u></b>	Q4A189	Beclina 1 ( <i>Glycine max</i> )	85,5
<b>NN[Q/K][L/I]NASHK</b>	<b><u>NNGVNASHK</u></b>	CAA79676	Beta-fructofuranosidasa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	
<b>[DV/IT]VANPESVE[L/I]K</b>	<b><u>DVINPEEVEIK</u></b>	Q1PF25	Proteína de dedos de zinc ( <i>A. thaliana</i> )	67
<b>G[DV/IT]VANPESVE[L/I]K</b>	<b><u>GDDVINPEEVEIK</u></b>	Q1PF24	Proteína de dedos de zinc ( <i>A. thaliana</i> )	69,6
<b>VTN(X)XX[Q/K][Q/K]SVTVR</b>	<b><u>VSELGMNQKSVTVF</u></b>	CAN80304	Proteína hipotética ( <i>Vitis vinifera</i> )	
<b>GSTTAESAA[L/I]R</b>	<b><u>ATTAETSALR</u></b>	Q9LUI6	Proteína de tipo kinasa ( <i>A. thaliana</i> )	74,7
<b>STDA[L/I]SK</b>	<b><u>STEALSK</u></b>	P00871	Ribulosa bisfosfato carboxilasa ( <i>Triticum aestivum</i> )	94
<b>PAVV[L/I]</b>	<b><u>PAVVI</u></b>	Q9M364	Histona-lisina N-metiltransferasa ( <i>A. thaliana</i> )	100
<b>SE[Q/K][Q/K]CXXK</b>	<b><u>SDKKCRKK</u></b>	Q8W397	Amelogenina ( <i>O. sativa</i> )	94,2
<b>[L/I][F/Mox]S[L/I]CXXX[L/I][K/Q]R</b>	<b><u>LFDLCDDWLKR</u></b>	Q19VC7	Proteína D2 del centro de reacción del fotosistema II ( <i>Chlorokybus atmophyticus</i> )	90,9
<b>ANDLVDDK</b>	<b><u>ANELVEEK</u></b>	Q6RY59	Malato dehidrogenasa ( <i>Pinus pinaster</i> )	85,5
<b>[L/I][L/I][L/I]DPXXGDK</b>	<b><u>LLIDPITGQK</u></b>	Q7XR49	Proteína OSJNBa0043A12.36 ( <i>O. sativa</i> )	89,9
<b>[L/I]VDCC[Q/K]YE[Q/K]R</b>	<b><u>IVACCEFEER</u></b>	Q109L5	Proteína expresada ( <i>O. sativa</i> )	74,5

**Tabla 3.22.** Secuencias de fragmentos trípticos aislados del proteoma extracelular de cultivos celulares de *C. revoluta*. Los aminoácidos destacados en negrita muestran coincidencia con los pertenecientes a proteínas de la base de datos. El porcentaje de coincidencia entre el fragmento tríptico y el detectado en la base de datos se halló en el MPsrch del EBI, y engloba los aminoácidos conservados y semiconservados.

<i>Fragmento tríptico</i>	<i>Secuencia detectada en la base de datos</i>	<i>Nº acceso</i>	<i>Proteína</i>	<i>Coincidencia (%)</i>
<i>Enzimas implicadas en la oxidación de monolignoles</i>				
<b>GFDVVDNIK</b>	<u><b>GFDVVDNIK</b></u>	Q5JBR5	Peroxidasa aniónica ( <i>Ipomoea batatas</i> )	100
<b>MGQLNVLTGSKGEIR</b>	<u><b>MGQLNVLTGSKGEIR</b></u>	CAD92856	Peroxidasa ( <i>Picea abies</i> )	100
<b>DLVALSGAHTIGQAR</b>	<u><b>DLVALSGAHTIGQAR</b></u>	AAP76387	Peroxidasa ( <i>Gossypium hirsutum</i> )	100
<b>YYVDLQNR</b>	<u><b>YYVDLQNR</b></u>	CAH69262	Peroxidase 20 ( <i>O. sativa</i> )	100
<i>Otras</i>				
<b>TLISIGGGGSEVR</b>	<u><b>TLISIGGGGSEVR</b></u>	Q4W6L6	Quitinasa A ( <i>Cycas revoluta</i> )	100
<b>LVSELTAIR</b>	<u><b>LVSELTAIR</b></u>	Q4W6L6	Quitinasa A ( <i>C. revoluta</i> )	100
<b>[M/F]NEY[L/I][L/I]P[K/Q]</b>	<u><b>MNGYLIPK</b></u>	Q0WQP3	Citocromo P450 ( <i>A. thaliana</i> )	87
<b>[F/M]GV[L/I]AVTSR</b>	<u><b>MSVIIVTSR</b></u>	O22920	Antitransportador Na/H ( <i>A. thaliana</i> )	78,7
<b>[L/I]S[L/I]TPTPGV[L/I]H[K/Q]</b>	<u><b>LLITPTSPAVLHQ</b></u>	Q0IV71	Proteína Os11g0108800 ( <i>O. sativa</i> )	67
<b>TDV[L/I]G[L/I]PA[K/Q]</b>	<u><b>SNVIGLPAH</b></u>	Q0IYK2	Proteína Os10g0200000 ( <i>O. sativa</i> )	76,7
<b>KTA[L/I]N[L/I]DA[L/I]DWR</b>	<u><b>KTSLKLDTMDW</b></u>	Q9LDG2	Proteína hipotética F24F17.6 ( <i>A. thaliana</i> )	72,6
<b>FAQ[L/I][L/I]ND[L/I][K/Q]</b>	<u><b>EGKLIADIK</b></u>	Q2RAP8	2-Isopropilmalato sintasa B ( <i>O. sativa</i> )	
<b>IVDYCPAGCR</b>	<u><b>IVDYCPAGCR</b></u>	Q6K4C0	Proteína p12 asociada a la patogénesis ( <i>O. sativa</i> )	100



Los resultados mostraron la presencia de fragmentos peptídicos que presentan homologías con proteínas típicas de la pared celular vegetal: óxido-reductasas como las lacasas, las peroxidasas y las germinas; glucósido hidrolasas como las quitinasas y proteínas de señalización.

Todos los fragmentos trípticos encontrados en el medio extracelular de suspensiones celulares de *B. pendula* se corresponden con peroxidasas y germinas, ambas proteínas íntimamente relacionadas con la lignificación de paredes celulares. Las suspensiones de *G. biloba* presentaron enzimas relacionadas con la biosíntesis de ligninas en la pared celular (peroxidasas y lacasas), glucósido hidrolasas (quitinasas y glucanasas), proteínas de señalización (tipo kinasa), proteínas relacionadas con el ADN y ARN (proteínas de dedos de zinc, histona-lisina *N*-metiltransferasa), y otro tipos de proteínas bien intracelulares (ribulosa bífosfato carboxilasa, proteína del centro de reacción del fotosistema II, malato deshidrogenasa) o bien de función desconocida. En el caso de *C. revoluta* los fragmentos trípticos se correspondieron con peroxidasas, glucósido hidrolasas (quitinasas), proteínas intracelulares (citocromo P450) o proteínas de función desconocida.

Estas proteínas se han descrito que intervienen en la xilogénesis y/o en la formación de las paredes celulares secundarias (Brown y cols. 2005, Yokoyama y Nishitani 2006, Blee y cols. 2001a, Imoto y cols. 2005, Foucart y cols. 2006), y entre ellas cabe destacar a las peroxidasas, las lacasas, las glucósido hidrolasas de la familia 19 como la quitinasa, la malato deshidrogenasa, las  $\beta$ -1,3-glucanasas, las proteínas de tipo citocromo P450, las proteínas dedos de zinc y ciertas protein kinasas.

La homología de estos fragmentos trípticos con proteínas típicas de la pared celular, y con proteínas que intervienen en la xilogénesis, no resulta novedoso puesto que se han descrito ESTs que codifican peroxidasas y quitinasas en las suspensiones celulares de *Populus* (Lee y cols. 2005); peroxidasas, germinas, endoquitinasas y malato deshidrogenada en *Medicago sativa* (Watson y cols. 2004); peroxidasas y 1,3- $\beta$ -glucanasas en *Medicago truncatula* (Lei y cols. 2005); peroxidasas, quitinasas, lacasas, malato deshidrogenasa, citocromo P450, y Ser/Thr kinasa, en *Zea mays* (Zhu y cols. 2006, Guillaumie y cols. 2007); y peroxidasas,  $\beta$ -1,3-glucanasa, protein kinasa, germinas, quitinasas (familia 19 de las glucósido hidrolasas) y malato deshidrogenasa, en *Arabidopsis* (Chivasa y cols. 2002, Boudart y cols. 2005, Charmont y cols. 2005, Kwon y cols. 2005, Ubeda-Tomas y cols. 2007).

Por último, los resultados también mostraron homologías con proteínas que se expresan durante la diferenciación de las células de mesófilo en traqueidas de *Z. elegans* (Milioni y cols. 2001, Milioni y cols. 2002, Demura y cols. 2002, Pesquet y cols. 2005), y entre ellas cabe citar a las peroxidasas, quitinasas, lacasas, proteína p12 asociada a plagas, metil transferasas, glucanasas, proteínas asociadas con la senescencia, proteína del tipo citocromo P450, Ser/Thr kinasas y proteínas dedos de zinc.

En los estudios del proteoma son abundantes las glucosil hidrolasas, ya que participan en la remodelación de la pared celular. En las especies estudiadas, sin embargo, no aparecen. También se ha comprobado esta ausencia en cultivos celulares de *Arabidopsis*

(Jamet y cols. 2006), a pesar de esperarse debido a que son células en proceso de división y elongación, y que por lo tanto necesitan modificar los polisacáridos de la pared celular. Aún así, este hecho puede explicarse por una baja homología de estas proteínas entre diferentes cultivos celulares.

Es interesante hacer notar que las óxido reductasas son particularmente numerosas en los cultivos celulares, probablemente debido al estrés oxidativo que ocurre en los cultivos en medio líquido (Jamet y cols. 2006), igual que ocurre con otras proteínas relacionadas con la defensa (Borderies y cols. 2003). En efecto, Barratt y cols. (1989) han demostrado que algunas proteínas relacionadas con el estrés son inducidas por el mismo proceso del cultivo *in vitro*.

#### *Lacasas*

Las lacasas son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las oxidasas de cobre azul, que incluye ascorbato oxidasas, lacasas y ceruloplasmina. Se encuentran en un amplio rango de organismos: bacterias, hongos, insectos y plantas. En estas últimas el papel de las lacasas permanece sin ser claramente demostrado. Varias evidencias sugieren su implicación en la biosíntesis de ligninas, basándose en la capacidad de oxidar los precursores de la lignina y en su localización en las paredes celulares del xilema (Davin y cols. 1992, Driouich y cols. 1992, Sterjiades y cols. 1992, Bao y cols. 1993, Dean y Eriksson 1994, McDougall y Morrison 1996). Pero su papel más obvio sería el de participar en el control del estado redox de la pared celular a través del control de los niveles de ácido ascórbico (Ros Barceló y cols. 2006), ya que estas enzimas presentan una gran actividad ascorbato oxidasa. Se ha sugerido que ya que las lacasas no necesitan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podrían tener un papel en los primeros estadios de lignificación en las células (Sterjiades y cols. 1993). La ausencia de secuencias de lacasas ha sido un argumento contra su papel en la lignificación (Lewis y cols. 1999). Además, los estudios de expresión de lacasas son poco habituales y contradictorios (Ranocha y cols. 1999, Gavnholt y cols. 2002). La idea general es que estas enzimas se secretan al apoplasto (LaFayette y cols. 1999, Ranocha y cols. 1999), pero se han encontrado lacasas que carecen de la extensión N-terminal que conduce a las proteínas al apoplasto, por lo que estas enzimas podrían tener un origen intracelular (Gavnholt y cols. 2002).

#### *Proteínas tipo germina (GLPs)*

La germina detectada en el proteoma extracelular de *B. pendula* coincide con la expresada en el proteoma de *M. sativa* (Watson y cols. 2004) y en el de *A. thaliana* (Boudart y cols. 2005, Charmont y cols. 2005). Las germinas, y los polipéptidos relacionados con las germinas, se incluyen en la superfamilia de las cupinas (Dunwell 1998). Las germinas se pueden clasificar en dos grupos, las germinas propiamente dichas, que son un grupo de proteínas con una identidad superior al 90% específicas de las gramíneas, y las proteínas tipo germina (GLPs), que son muy heterogéneas y se encuentran presentes en todas las familias de angiospermas, incluidas las gramíneas, así como también en las gimnospermas

y en los musgos (Bernier y Berna 2001). Tanto las germinas, como las GLPs, son glicoproteínas de la matriz extracelular normalmente ancladas a ésta mediante uniones iónicas débiles. La mayoría de ellas existen como oligómeros muy estables y llevan unido un ión metálico, normalmente manganeso. Las proteínas de la superfamilia de las cupinas presentan un amplio rango de actividades enzimáticas, aunque parece que la principal función de las GLPs es como superóxido dismutasa que protege a las plantas del estrés oxidativo (Khuri y cols. 2001). Sin embargo, las germinas de los cereales han evolucionado a una actividad oxalato oxidasa que permite la detoxificación del ácido oxálico producido por patógenos (Dunwell y cols. 2000). Con respecto a la expresión, los miembros de la familia de las GLPs están fuertemente regulados. Sin embargo, todos los órganos se caracterizan por la presencia de, al menos, una GLP.

Aunque las germinas y las GLPs fueron descritas en principio en el contexto de la germinación, se expresan en muchos tejidos vegetales y en diferentes estados de desarrollo (Schlesier y cols. 2004). Se ha descubierto un amplio rango de funciones para las germinas y las GLPs: algunas son enzimas (oxalato oxidasas, SODs, inhibidores de proteasas (Segarra y cols. 2003)) mientras otras parecen ser receptores o proteínas estructurales. Lane (2000) ha sugerido que la expresión de la germina en el embrión del trigo está asociada con el desarrollo de los tejidos, y la diferenciación de los tejidos vasculares, sugiriendo un papel en la muerte celular programada. Aún así, se desconoce la función de la mayoría de las GLPs detectadas.

La germina también se sintetiza en las hojas adultas que sufren estrés. Muchas de ellas se inducen por estreses bióticos (Thordahl-Christensen y cols. 1997, Schweizer y cols. 1999) y abióticos (Hurkman y Tanaka 1996, Vallelian-Bindschedler y cols. 1998). Así, la transcripción de la germina y la actividad oxalato oxidasa se estimulan por la infección fúngica (Dumas y cols. 1995, Zhang y cols. 1995), por algunos iones de metales pesados, y por la infección vírica, en plantas de tabaco transformadas con el gen chivato GUS bajo el control de un promotor del gen de la germina del trigo (Berna y Bernier 1999).

Las GLPs se expresan en todas las partes de las plantas y en todos los estados de desarrollo, desde las raíces hasta los ápices de los brotes, en los órganos florales, y desde la germinación del embrión hasta el desarrollo del fruto. Las ESTs depositadas en las bases de datos también demuestran la expresión de GLPs en las células diferenciadas del xilema de pino y de *Populus* (Berna y Bernier 1999). Al igual que los genes de la germina, la transcripción de algunos genes de GLP están influenciados por las condiciones de estrés.

Las reacciones redox juegan diversos papeles en las paredes celulares vegetales durante el desarrollo, y también como respuesta al ataque de patógenos (Torii 2004, Fry 1998, Passardi y cols. 2004b). Además de las peroxidasas, otras proteínas de la pared celular pueden estar implicadas en este proceso. Las germinas y las proteínas tipo germina constituyen una gran familia diversa de proteínas vegetales muy ubicuas. En los cereales, se describen como oxalato oxidasas, fuertemente asociadas a la hemicelulosa, cuya síntesis está ligada al aumento de la extensibilidad de la pared celular (Lane 1994); aunque en numerosas dicotiledóneas no se ha encontrado esta actividad. En el algodón, se ha

descubierto una proteína tipo germina que se acumula en el apoplasto de la fibra durante la elongación celular (Membré y cols. 2000, Kim y cols. 2004).

### Quitinasas

La presencia de la quitinasa en la pared celular, y su expresión durante la xilogénesis se encuentra universalmente aceptada (Robertson y cols. 1997, Blee y cols. 2001a, Demura y cols. 2002, Borderies y cols. 2003, Watson y cols. 2004, Charmont y cols. 2005, Kwon y cols. 2005, Lee y cols. 2005, Jamet y cols. 2006, Zhu y cols. 2006). Las quitinasas (EC 3.2.1.14) (Santos y cols. 2004, Tchorbadjieva y Pantchev 2006) catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4 de la quitina, un polímero de *N*-acetil-*D*-glucosamina. Las quitinasas se expresan en muchas especies vegetales en respuesta al ataque de patógenos o a otros estreses ambientales. Aunque el principal papel de las quitinasas sea en la defensa contra patógenos, también tienen un papel en el desarrollo de la planta. Una endoquitinasa ácida de *Arabidopsis* codifica proteínas con una elevada homología a las “yieldinas”, que están implicadas en la modulación de las propiedades mecánicas de la pared celular en plantas de *Vigna unguiculata* (Okamoto-Nakazato y cols. 2000). Se ha visto que las quitinasas se activan en tabaco durante la formación de la flor, pero no durante la formación de yemas vegetativas (Neale y cols. 1990). En otras plantas, como calabaza y *Arabidopsis*, diferentes quitinasas se activan en distintos órganos de la flor o se activan de forma diferente durante el desarrollo de la misma (Lawton y cols. 1994, Samac y Shah 1991). También se ha detectado actividad quitinasa en otros órganos como raíces, frutos y semillas (Gramham y Sticklen 1994, Salzman y cols. 1998, Regalado y cols. 2000). Además de su posible papel en la respuesta de defensa en las plantas, las quitinasas también influyen en el desarrollo de los embriones somáticos en *Daucus carota* (De Jong y cols. 1992), *Picea abies* (Mo y cols. 1996) y *Pinus caribaea* (Domon y cols. 2000), quizás mediante la liberación de factores endógenos que actúan como moléculas señal.

### IV.1. Proteínas no canónicas de la pared celular

Las proteínas no canónicas de la pared celular son conocidas como proteínas intracelulares, descritas tanto en plantas superiores (Chivasa y cols. 2002, Watson y cols. 2004) como en algas verdes (Wang y cols. 2004) y hongos (Pitarch y cols. 2002). La presencia de estas proteínas resulta confusa, ya que no poseen un péptido señal, el cual es necesario para dirigirse a la ruta de secreción, y su función en la pared no está clara (Slabas y cols. 2004). Bendtsen y cols. (2004) han clasificado este grupo de proteínas como proteínas no clásicas. En los estudios de Chivasa y cols. (2002) y Watson y cols. (2004), las proteínas de la pared celular no canónicas pueden representar la mitad de las proteínas identificadas en las preparaciones de la pared celular. Estas han sido extraídas de paredes celulares aisladas, pero los resultados dependen en gran medida de la fiabilidad de las técnicas de purificación usadas. Cuando se utilizan técnicas no destructivas (Boudart y cols. 2005) para aislar las proteínas de la pared celular, se encuentran tan sólo unas pocas

proteínas no canónicas, apoyando la idea de que se trata, probablemente, de contaminantes citosólicos. De todos modos, mediante inmunolocalización se ha visto la presencia en la pared celular o el espacio extracelular de proteínas previamente conocidas como citosólicas (Edwards y cols. 1999, Robertson y cols. 2000)

Slabas y cols. (2004) encontraron la presencia de una citrato sintasa en paredes celulares de *Arabidopsis*. Ésta es una enzima localizada en la mitocondria. Sin embargo, de los hipotéticos productos de los cinco genes que las codifican, uno de ellos presenta un péptido señal de secreción. Pero también se han encontrado otras proteínas sin dominios de secreción. Estos autores sugieren que existe un mecanismo desconocido, distinto del clásico, para exportar estas proteínas a la pared celular.

En este caso, la presencia de la rubisco (Tabla 3.21) y de varias proteínas citosólicas relacionadas con los ácidos nucleicos (Tabla 3.20) parece indicar que son producto de una contaminación de componentes citosólicos, al menos en las suspensiones de *G. biloba*.

#### *Protein kinasas*

Chivasa y cols. (2002) identificaron secuencias de aminoácidos de proteínas que poseían las mismas características que las proteínas clásicas de la pared celular, la posesión de un péptido señal, y la ausencia tanto de una secuencia conservada de retención en el retículo endoplasmático como de un dominio transmembrana. Estas proteínas incluyen, entre otras, una posible protein quinasa. De la presencia de estas proteínas en las paredes celulares surge una cuestión sobre su posible función en este compartimento celular. Parece que estas proteínas tienen una función que es diferente de la actividad biológica que presentan en sus compartimentos clásicos (Chivasa y cols. 2002). En el caso de las protein kinasas, poseen un péptido señal y carecen de dominio transmembrana, lo que sugiere que se localizan en el lado apoplástico de la membrana plasmática. Chivasa y cols. (2002) demostraron que existen posibles protein kinasas en el apoplasto, que fosforilan ciertas proteínas, entre ellas, una proteína tipo quitinasa. Así, parece existir una fosforilación/defosforilación extracelular de proteínas localizadas en el apoplasto durante el crecimiento celular normal, y en respuestas de señalización que incluyen el ataque de patógenos. Esta observación es coherente con la existencia de protein kinasas extracelulares en la pared celular; sin embargo, se desconoce qué clase de kinasas de la pared celular son responsables de la actividad quinasa extracelular. En los actuales modelos de transducción de la señal, el único evento que parece que ocurre extracitoplasmáticamente es la unión de ligandos a sus receptores transmembrana, seguido de la transmisión de la señal hacia los componentes citoplásmicos. La identificación de estas proteínas en la pared celular podría ser un reflejo de la existencia de nuevas rutas de señalización extracitoplasmáticas que implican señales dependientes de los eventos de fosforilación. Durante mucho tiempo, esta posibilidad era inconcebible porque se presumía que los compuestos ricos en energía fosfato, tipo ATP y GTP, no se encontraban extracitoplasmáticamente (Eisenhaber y Bork 1998). Sin embargo, recientemente se ha observado ATP en la matriz extracelular de células animales (Sedaa y cols. 1990), en el

fluido extracelular de levaduras (Boyum y Guidotti 1997) y, más recientemente, en el apoplasto de las plantas (Thomas y cols. 2000).

#### *Citocromo P450*

El citocromo P450 detectado en el medio extracelular de *C. revoluta* también se presenta en el perfil de expresión de la biosíntesis de la pared celular en el maíz (Guillaumie y cols. 2007), y es un gen que se expresa durante la xilogénesis en el eucalipto (Foucart y cols. 2006).

El citocromo P450 es una oxidasa dependiente del grupo hemo que cataliza una amplia variedad de reacciones usando NAD(P)H como donador de electrones (Pua y Lee 2003). En las plantas se asocia a la curación de heridas, a la resistencia a patogénesis, a la síntesis de metabolitos secundarios durante la proliferación celular, a la respuesta a los estreses ambientales y a la detoxificación de xenobióticos (Lee y cols. 2005). Foucart y cols. (2006) encontraron un gen que codifica al citocromo P450 90A, que probablemente está implicado en la biosíntesis de giberelinas (GA). En este punto cabe mencionar que las GA están implicadas en la xilogénesis como se ha demostrado en plantas de tabaco transgénico, y de *Populus*, que sobreexpresan la GA20 oxidasa (Eriksson y cols. 2000, Biemelt y cols. 2004).

#### *Malato deshidrogenasas*

Zhu y cols. (2006) encontraron en su estudio proteómico de la pared celular del maíz varias proteínas citosólicas, tales como la malato deshidrogenasa citoplásmica, la cual, se detectó en este estudio en *G. biloba*. Esta proteína también se encontró en el fluido apoplástico de la cebada y la avena (Li y cols. 1989). Tanto en este estudio como en otros estudios proteómicos de la pared celular, se han descrito proteínas que se secretan a las paredes celulares sin poseer el clásico péptido señal N-terminal (Cleves 1997). En otros sistemas, como en los mamíferos, también se ha observado que muchas proteínas que no contienen péptido señal pueden ser secretadas a la matriz extracelular.

La malato deshidrogenasa podría estar implicada en la producción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las paredes celulares (Gross y cols. 1977, Fry 1988). Ciertos autores (Li y cols. 1989, Kärkönen y cols. 2002, Watson y cols. 2004) han demostrado que una malato deshidrogenasa unida a la pared celular podría estar implicada en la regeneración del NAD(P)H necesario para la formación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requerido por una peroxidasa de la pared celular.

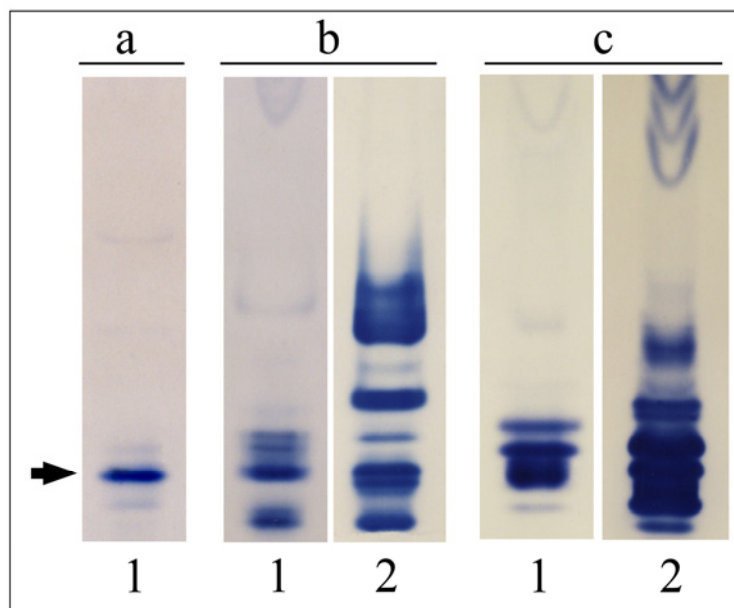
#### **IV.2. Proteínas de función desconocida**

En todos los análisis del proteoma de la pared celular aparece una serie de proteínas de las cuales no se conoce qué función pueden tener (Robertson y cols. 1997, Borderies y cols. 2003, Ndimba y cols. 2003, Watson y cols. 2004, Boudart y cols. 2005, Kwon y cols. 2005, Jamet y cols. 2006) al no mostrar homologías con proteínas de otros organismos. Se dice que podrían ser proteínas específicas de plantas, ya que la función de la mayoría de las

proteínas identificadas se deduce por homología con proteínas de otros organismos, mientras que sólo 16 proteínas tienen función conocida (Boudart y cols. 2005). En algún caso puede llegar a suponer el 26% de las proteínas encontradas (Borderies y cols. 2003). Por lo tanto, las proteínas de función desconocida son uno de los grandes retos para los grupos de proteómica de la pared celular.

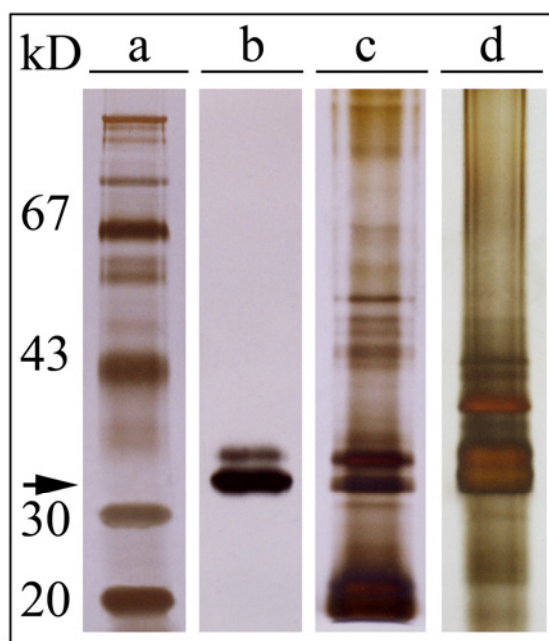
## V. Purificación de las peroxididasas del medio extracelular de suspensiones celulares de angiospermas y gimnospermas

Como se comprobó anteriormente, las células de los cultivos vegetales lignifican (Figura 3.11) y secretan al medio una serie de proteínas extracelulares. De hecho, un gran porcentaje de estas proteínas son peroxididasas (Tablas 3.20, 3.21 y 3.22). Por lo tanto, no es extraño que existan numerosos estudios en los que se han utilizado las suspensiones celulares como herramienta para purificar peroxididasas (Dean y cols. 1994, Brownleader y cols. 1995, Narita y cols. 1995, Østergaard y cols. 1996, de Marco y cols. 1999, Gabaldón y cols. 2005). En concreto, se ha comprobado que la peroxidida purificada de *Zinnia elegans* por Gabaldón y cols. (2005) está implicada directamente en los procesos de lignificación. Por ello, se estudió el patrón de isoperoxidasas de *G. biloba* y *B. pendula*, resultando que ambos cultivos secretan al medio extracelular peroxididasas análogas y homólogas a la de *Z. elegans* (Figura 3.21) y proteínas homólogas en cuanto a su masa molecular (Figura 3.22). Además, se comparó dicho patrón de peroxididasas con el obtenido del fluido intercelular de las plantas intactas (Figura 3.21), que resultó ser bastante semejante, con todas las peroxididasas del fluido intercelular presentes en el medio extracelular.



**Figura 3.21.** Patrones de isoenzimas de peroxidasa obtenidos por IEF de la proteína extracelular de tallos (1) y de cultivos celulares (2) de *Z. elegans* (a), *G. biloba* (b) y *B. pendula* (c); después de teñir con 4-MN y  $H_2O_2$ . La flecha señala las peroxididasas homólogas a la peroxidasa de *Z. elegans*.





**Figura 3.22.** SDS-PAGE de la proteína extracelular de suspensiones celulares de *G. biloba* (c), y *B. pendula* (d), después del revelado con nitrato de plata. Marcadores de peso molecular (a) y peroxidasa de *Z. elegans* (b). La flecha señala las proteínas homólogas a la peroxidasa de *Z. elegans*.

Cuando se comparó la actividad peroxidasa del apoplasto de tallos jóvenes y del medio extracelular de suspensiones celulares de *B. pendula* frente a distintos sustratos precursores de las ligninas (Tabla 3.23), se encontró que estos dos sistemas son perfectamente comparables, puesto que las afinidades tanto por los alcoholes como por los aldehídos *p*-hidroxicinámilicos son muy similares, con la salvedad del alcohol sinapílico y del sinapilaldehído. La afinidad relativa frente a estos dos sustratos que muestran las peroxidosas presentes en el apoplasto es mayor que la que tienen las peroxidosas del medio extracelular de las suspensiones celulares.

**Tabla 3.23.** Actividad peroxidasa expresada en  $\text{nkat ml}^{-1}$  y actividad peroxidasa relativa, del medio extracelular de suspensiones celulares y del apoplasto de *B. pendula* medida con diferentes sustratos. La actividad peroxidasa relativa se expresa dando el valor 1 a la obtenida frente a 4-MN.

Sustrato	Actividad peroxidasa ( $\text{nkat ml}^{-1}$ )		Actividad peroxidasa relativa	
	Suspensiones celulares	Apoplasto	Suspensiones celulares	Apoplasto
4-MN	45,28±1,36	2,69±0,16	1	1
TMB	749,48±40,83	55,90±4,92	16,55	20,78
Alcohol <i>p</i> -cumarílico	32,87±0,73	2,46±0,39	0,73	0,91
Alcohol coniferílico	581,89±16,61	28,31±3,59	12,85	10,52
Alcohol sinapílico	6,42±0,29	2,13±0,03	0,14	0,79
<i>p</i> -Cumarilaldehído	3,78±0,12	0,23±0,06	0,08	0,09
Coniferilaldehído	309,45±32,55	20,61±1,98	6,83	7,66
Sinapilaldehído	4,16±0,29	0,61±0,10	0,09	0,23

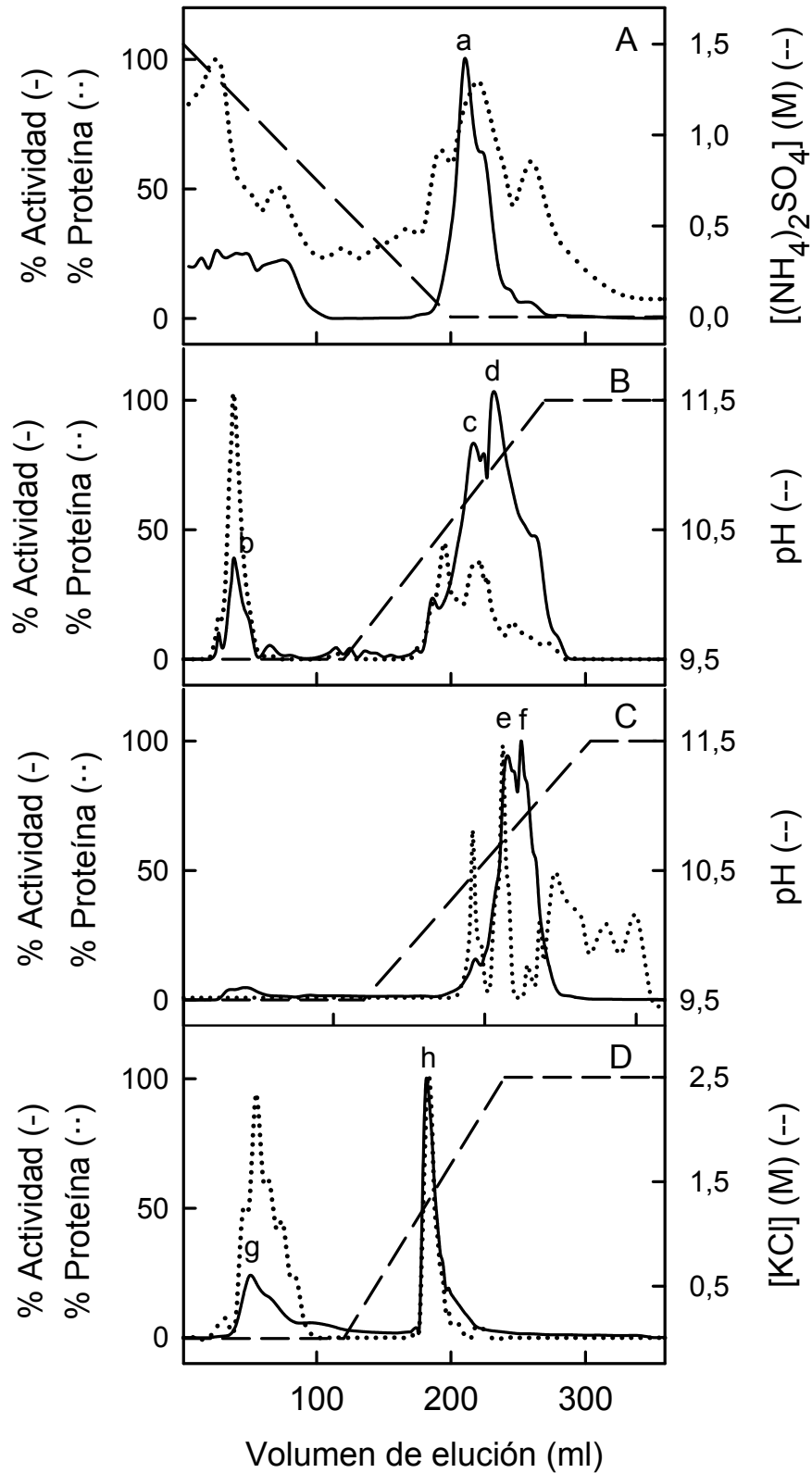
A la vista de estos resultados, se procedió a purificar, de forma parcial, las peroxidasas presentes en el medio extracelular de suspensiones celulares de *B. pendula* con el fin de comprobar las afinidades de las peroxidasas ácidas y básicas por los diferentes sustratos.

### **V.1. Purificación parcial de las peroxidasas del proteoma extracelular de *B. pendula***

Las suspensiones celulares son una fuente adecuada para la purificación de peroxidasas. Chibbar y van Huystee (1983) determinaron que a los 4 días de cultivo de suspensiones celulares de cacahuete las peroxidasas representaban el 15% de las proteínas extracelulares. Este dato, junto con el bajo porcentaje de proteínas liberadas, facilitan la purificación de peroxidasas (Maldonado y van Huystee 1980).

Como paso inicial de la purificación, la proteína extracelular se sometió a una precipitación total con sulfato amónico al 95% de saturación. El siguiente paso fue una cromatografía hidrofóbica sobre fenil Sepharosa, utilizando como eluyente un gradiente de sulfato amónico. La fenil Sepharosa se ha utilizado con éxito en la purificación de las peroxidasas de *Z. elegans*, cebada, vid y alcachofa (Gabaldón y cols. 2005, Sato y cols. 1995b, Kristensen y cols. 1999, Jackson y cols. 2001, López-Molina y cols. 2003), por lo que ha sido y sigue siendo uno de los pasos iniciales más ampliamente utilizado en la purificación de las peroxidasas.

En esta cromatografía, la mayor parte de la peroxidasa eluyó en un único pico, entre los 170 y 280 ml (Figura 3.23A, pico a). Este pico se recromatografió en una columna de intercambio catiónico obteniendo tres fracciones: la primera se correspondió (Figura 3.23B, pico b) con la peroxidasa no retenida en la columna; la segunda (Figura 3.23B, pico c) eluyó entre los 175 y 227 ml y la tercera (Figura 3.23B, pico d) entre los 228 y 280 ml. A su vez, estos dos últimos picos (c y d) se volvieron a recromatografiar en una resina de intercambio catiónico, para purificar más las muestras. El pico c eluyó como dos picos diferenciados en la nueva cromatografía catiónica (Figura 3.23C), el primero entre los 190 y 220 ml (Figura 3.23C, pico e) y el segundo entre los 221 y 245 ml (Figura 3.23C, pico f). De este modo se obtuvieron tres fracciones de peroxidasas básicas, denominadas BpPrx1, BpPrx2 y BpPrx3 en función del orden en el que eluyeron en las dos cromatografías catiónicas (Tabla 3.24). La fracción no retenida por la columna de intercambio catiónico (Figura 3.23B, pico b) se cromatografió sobre una resina de intercambio aniónico, resolviéndose en dos picos: uno no retenido por la columna (Figura 3.23D, pico g) y otro que eluyó entre los 175 y 220 ml (Figura 3.23D, pico h). Con este último paso se separaron dos fracciones de peroxidasas ácidas, denominadas BpPrx4 y BpPrx5, respectivamente (Tabla 3.24).



**Figura 3.23.** Purificación de peroxidasas de *B. pendula* del medio extracelular de suspensiones celulares. El protocolo de purificación incluyó una cromatografía en fenil Sepharose (A), cromatografía de intercambio catiónico en SP Sepharose (B y C) y cromatografía aniónica en Q Sepharose (D).

**Tabla 3.24.** Fracciones de peroxidasa de *B. pendula* obtenidas en las diferentes cromatografías (Figura 3.23) y la nomenclatura asignada a cada una de ellas.

<b>Nombre peroxidasa</b>	<b>pl</b>	<b>Fracciones de peroxidasa correspondiente</b>
BpPrx1	Básico	Pico e
BpPrx2	Básico	Pico f
BpPrx3	Básico	Pico d
BpPrx4	Ácido	Pico g
BpPrx5	Ácido	Pico h

Ya que no se pudieron purificar a homogeneidad las fracciones obtenidas, se procedió directamente a determinar sus propiedades catalíticas (Tabla 3.25). Todas las peroxidasas fueron capaces de oxidar tanto los alcoholes como los aldehídos *p*-hidroxicinamílicos, lo que confirma su papel en la lignificación.

**Tabla 3.25.** Actividad catalítica de las fracciones de peroxidasa purificadas de *B. pendula* frente a diferentes sustratos.

<b>Sustratos</b>	<b><i>k</i>catalítica (molesSs<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>E)</b>				
	BpPrx1	BpPrx2	BpPrx3	BpPrx4	BpPrx5
4MN	17,30 ± 1,25	15,52 ± 0,37	49,53 ± 8,81	8,96 ± 0,58	44,5 ± 3,5
TMB	145,53 ± 1,12	139,58 ± 4,43	209,96 ± 11,08	214,19 ± 32,65	193,9 ± 24,8
Alcohol <i>p</i> -cumarílico	3,87 ± 0,15	5,17 ± 0,15	7,22 ± 0,13	1,14 ± 0,08	0,51 ± 0,03
Alcohol coniferílico	54,76 ± 7,72	70,83 ± 12,06	91,00 ± 5,47	36,38 ± 1,25	9,84 ± 0,69
Alcohol sinapílico	0,33 ± 0,01	0,41 ± 0,05	0,55 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,18 ± 0,01
<i>p</i> -Cumarilaldehido	0,56 ± 0,13	0,74 ± 0,15	1,34 ± 0,01	0,30 ± 0,09	0,10 ± 0,02
Coniferilaldehido	88,16 ± 5,97	92,93 ± 6,84	110,08 ± 6,00	41,32 ± 2,47	10,21 ± 0,40
Sinapilaldehido	1,08 ± 0,10	1,39 ± 0,12	2,18 ± 0,01	0,81 ± 0,05	0,60 ± 0,14

Las fracciones de peroxidasas presentan unas afinidades por los sustratos hidroxicinamílicos semejantes (Tabla 3.26). La peroxidasa ácida BpPrx4 presenta para la mayoría de los sustratos mayor afinidad que la otra peroxidasa ácida BpPrx5 y similar a las peroxidasas básicas. No se aprecian diferentes afinidades entre las peroxidasas básicas, BpPrx1 y BpPrx2, y la peroxidasa ácida BpPrx4, por lo que en este caso no se puede relacionar el pl de las peroxidasas con una afinidad diferencial hacia los sustratos precursores de las ligninas, y particularmente hacia el alcohol sinapílico. Sin embargo, se ha descrito que las peroxidasas ácidas del xilema de *B. pendula*, y particularmente la más ácida, muestran más capacidad de oxidar el alcohol sinapílico que el alcohol coniferílico, mientras que las básicas oxidan preferencialmente el alcohol coniferílico (Marjamaa y cols. 2006b).

**Tabla 3.26.** Actividad peroxidasa relativa de las fracciones de peroxidasa purificadas de *B. pendula* frente a diferentes sustratos. Esta actividad se expresa dando el valor 1 a la obtenida frente a 4-MN.

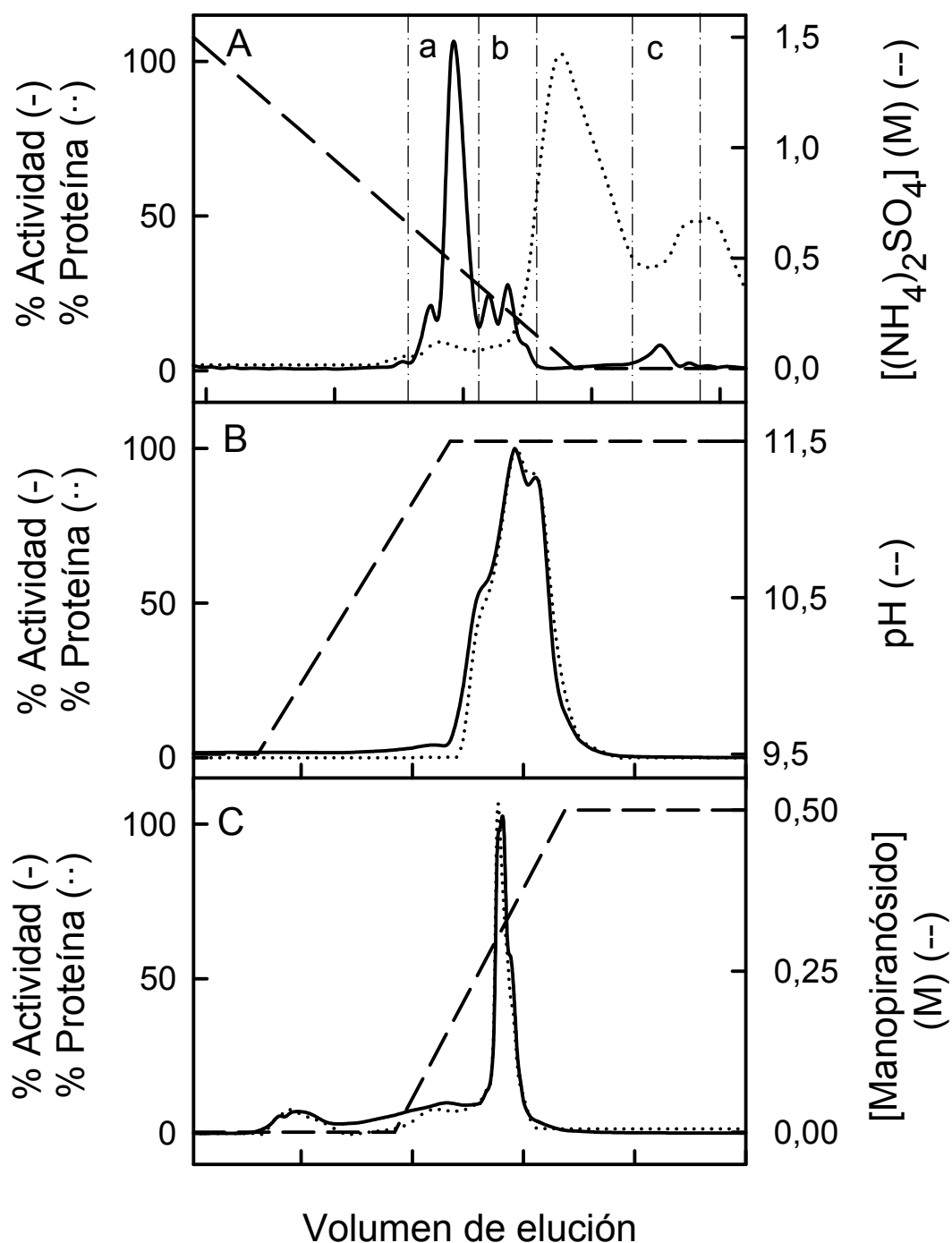
Sustratos	Actividad peroxidasa relativa				
	BpPrx1	BpPrx2	BpPrx3	BpPrx4	BpPrx5
4MN	1	1	1	1	1
Alcohol <i>p</i> -cumarílico	0,22	0,33	0,15	0,13	0,01
Alcohol coniferílico	3,17	4,56	1,84	4,06	0,22
Alcohol sinapílico	0,02	0,03	0,01	0,03	0,004
<i>p</i> -Cumarilaldehido	0,03	0,05	0,03	0,03	0,002
Coniferilaldehido	5,10	5,99	2,22	4,61	0,23
Sinapilaldehido	0,06	0,09	0,04	0,09	0,01

## V.2. Purificación y caracterización de la proteína más abundante en el proteoma extracelular de *G. biloba*

La proteína más abundante del proteoma extracelular de *G. biloba* tiene una masa molecular de aproximadamente 32000 Da (Figura 3.22), típica de las peroxidasas básicas, incluida la de *Z. elegans* (Gabaldón y cols. 2005). Por este motivo, se estableció un protocolo de purificación para esta proteína basado en el protocolo de purificación de la peroxidasa de *Z. elegans* (Gabaldón y cols. 2005).

Como paso inicial de la purificación la proteína extracelular se precipitó con sulfato amónico al 95% de saturación. El siguiente paso consistió en una cromatografía hidrofóbica. Puesto que la cromatografía sobre fenil Sepharosa elimina una gran cantidad del material que absorbe a 280 nm y, además, posee una alta capacidad para adsorber peroxidasa, resulta ser un método idóneo como paso inicial en la purificación de la proteína. Con este propósito, se realizó esta cromatografía con un gradiente decreciente lineal de sulfato amónico desde 1,5 M a 0 M. Durante esta cromatografía hidrofóbica (Figura 3.24A), la mayor parte de la peroxidasa eluyó en cuatro picos: el primero, y mayoritario, entre los 120 y los 155 ml (Figura 3.24A, fracción a); el segundo y el tercero, entre los 156 y los 190 ml (Figura 3.24A, fracción b); y el cuarto entre los 220 y los 275 ml (Figura 3.24A, fracción c). De todas estas fracciones se recogió la primera para continuar la purificación. Esta cromatografía supuso una disminución considerable de la cantidad de proteína total, y un aumento del Rz desde 0,68 a 1,25.

Dado el elevado punto isoeléctrico (pI) de la peroxidasa de *G. biloba* (Figura 3.21), en el siguiente paso cromatográfico se escogió un intercambiador con grupos sulfopropilo por presentar carga neta negativa en un amplio rango de pH, donde la peroxidasa presenta carga neta positiva. Durante la cromatografía de intercambio iónico (Figura 3.24B) se obtuvo una única fracción con actividad peroxidasa, entre los 140 y 155 ml de elución, y que presentó un Rz = 2,54.



**Figura 3.24.** Cromatografía sobre Fenil-Sepharosa™ 6 Fast Flow de la proteína extracelular de las suspensiones celulares de *G. biloba*, señalando las tres fracciones de peroxidasa obtenidas (a, b y c) (A). Cromatografía sobre SP Sepharosa™ Fast Flow de la peroxidasa purificada por cromatografía hidrofóbica (B). Cromatografía sobre Concanavalina A-Sepharosa® 4B de la peroxidasa purificada por cromatografía de intercambio iónico (C).

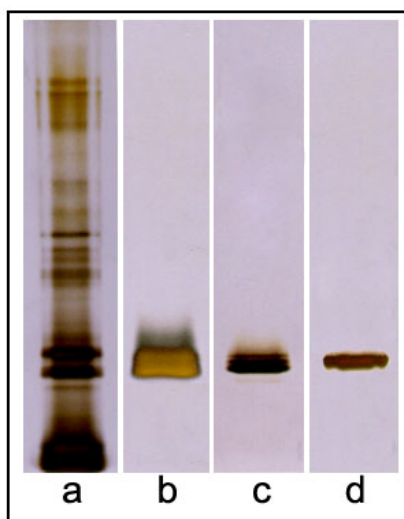
La naturaleza glicoproteica de las peroxidases (más concretamente la presencia de unidades manosa en sus glicanos) hace que estas enzimas puedan ligarse a lectinas del tipo de la Concanavalina A (Rodríguez Marañón y van Huystee 1994). El uso de la

Concanavalina A, unida a una matriz de Sepharosa 4B, se ensayó inicialmente durante la purificación de la peroxidasa de rábano (Brattain y cols. 1976), y desde entonces se utiliza frecuentemente en los esquemas de purificación de las peroxidases (Dean y Eriksson 1994, Christensen y cols. 1998, Loukili y cols. 1999, Gabaldón y cols. 2005). Por ello, la fracción de peroxidasa obtenida en la cromatografía de intercambio iónico se cromatografió sobre Concanavalina A, y se obtuvo una única fracción (Figura 3.24C), que se ligó a la Concanavalina A, y que eluyó con una concentración de 0,3 M de metil- $\alpha$ -D-manopiranosido. Estos resultados sugieren que la peroxidasa de *G. biloba* contiene glicanos con residuos terminales de  $\alpha$ -manosa.

El último paso consistió en una nueva cromatografía de intercambio iónico, obteniéndose una proteína pura a juzgar por el SDS-PAGE (Figura 3.25, calle d), de  $R_z = 2,35$ . A pesar de ello, el isoelectroenfoco bajo condiciones de no-equilibrio de la proteína purificada mostró dos isoformas (Figura 3.26, calle b). En la tabla 3.27 se resumen los pasos seguidos en el proceso de purificación y los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

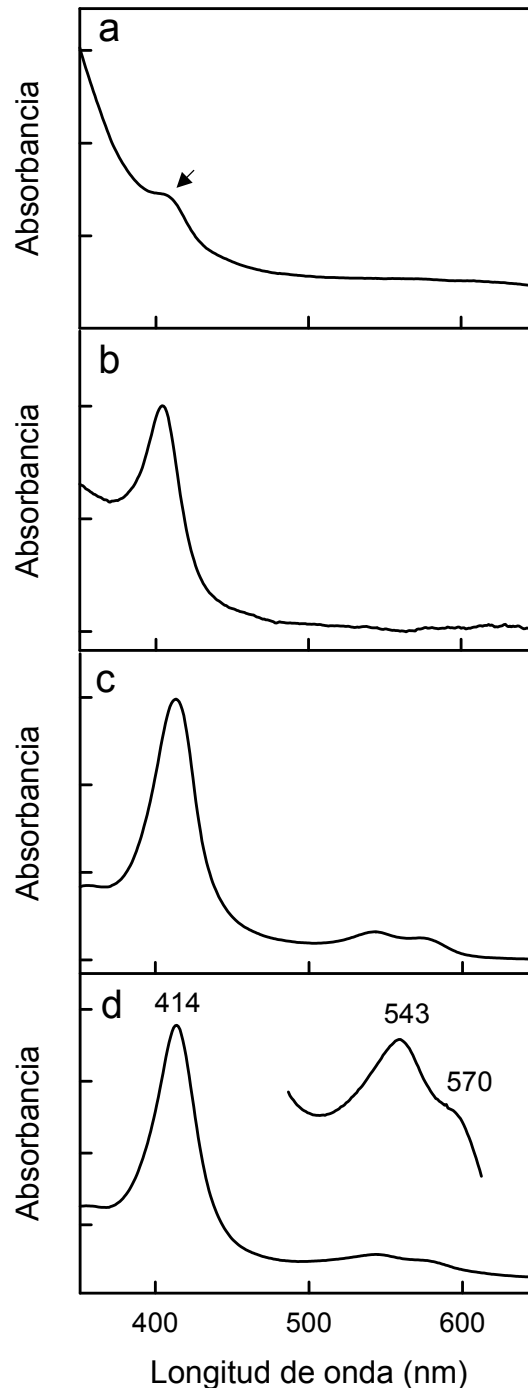
**Tabla 3.27.** Tabla de purificación de la peroxidasa de *G. biloba*. La actividad peroxidasa se midió usando TMB como sustrato.

<i>Etapa</i>	<i>Actividad peroxidasa total (nkat)</i>	<i>R<sub>z</sub></i>
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	80000	0,68
Phenil Sepharosa	89000	1,25
SP Sepharosa	2600	2,54
Con A Sepharosa	1000	---
SP Sepharosa	618	2,35



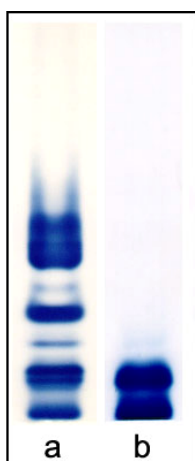
**Figura 3.25.** Análisis mediante SDS-PAGE de las diferentes etapas de purificación de la peroxidasa de *G. biloba* teñida con nitrato de plata. Proteína de suspensiones celulares (a). Proteína purificada mediante Phenil Sepharosa (b). Proteína purificada mediante SP Sepharosa (c). Proteína purificada mediante cromatografía de afinidad sobre Concanavalina A Sepharosa (d).

El espectro de absorción visible de la peroxidasa purificada de *G. biloba* mostró que se trataba de una peroxidasa atípica, con una banda Soret a 414 nm y bandas  $\alpha$  y  $\beta$  a 543 y 570 nm, respectivamente (Figura 3.27), típicas de las para-peroxidasas (peroxidasas de bajo espín) (Hagihara y cols. 1958, Yamazaki y cols. 1966).



**Figura 3.27.** Espectro de absorción visible de la proteína precipitada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (a), purificada sobre Phenil-Sepharosa<sup>TM</sup> 6 Fast Flow (b), purificada sobre SP Sepharosa<sup>TM</sup> Fast Flow (c) y purificada sobre Concanavalina A-Sepharosa<sup>®</sup> 4B (d). La proteína purificada presentó la banda Soret a 414nm, y las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  a 543 nm y a 570 nm, respectivamente.





**Figura 3.26.** Patrón isoenzimático obtenido por isoelectroenfoque bajo condiciones de no-equilibrio de la peroxidasa extracelular de *G. biloba* (a), y de la peroxidasa purificada (b), después de teñir con 4-MN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las para-peroxidasas son peroxidasas con propiedades peculiares que han sido aisladas de distintas especies (Theorell 1947, Shin y Nakamura 1961, Casella y cols. 1986, Battistuzzi y cols. 2001), y que tienen un espectro de absorción similar a los citocromos del grupo b, con máximos de absorción de la banda Soret comprendidos entre 410 y 420 nm. Cuando estas peroxidasas se tratan con agentes sulfhidrilos, pueden convertirse en peroxidasas normales, o de alto espín, con bandas Soret a 403 nm (Yamazaki y cols. 1966), por lo que se ha sugerido que el cianuro actúa como sexto ligando en este tipo de peroxidasas (Yamazaki y cols. 1967, Nissum y cols. 1998). Para comprobar si el cianuro es el sexto ligando de la peroxidasa de *G. biloba*, se trató la peroxidasa con HgCl<sub>2</sub> (Yamazaki y cols. 1967). Los resultados mostraron que esta peroxidasa no cambió su espectro después del tratamiento con HgCl<sub>2</sub>, manteniendo su máximo de absorción a 414 nm. Estos resultados sugieren que la peroxidasa de *G. biloba* es una peroxidasa de alto espín atípica, con un centro activo inusual, en el cual el sexto ligando no debe de ser el H<sub>2</sub>O.

El peso molecular de la peroxidasa de *G. biloba* se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 3.28). Los datos obtenidos del análisis MALDI-TOF (Figura 3.28) muestran un pico con m/z de 32499,45; y dos picos a m/z 16252,32 y 16442,85. De este análisis se deduce que la masa molecular de la peroxidasa de *G. biloba* es de 32499,45 la cual se encuentra dentro del rango de la masa molecular típica de las peroxidasas (Gabaldón y cols. 2005). El peso molecular y la pureza de la proteína se ratificó con un SELDI-TOF (Figura 3.29).

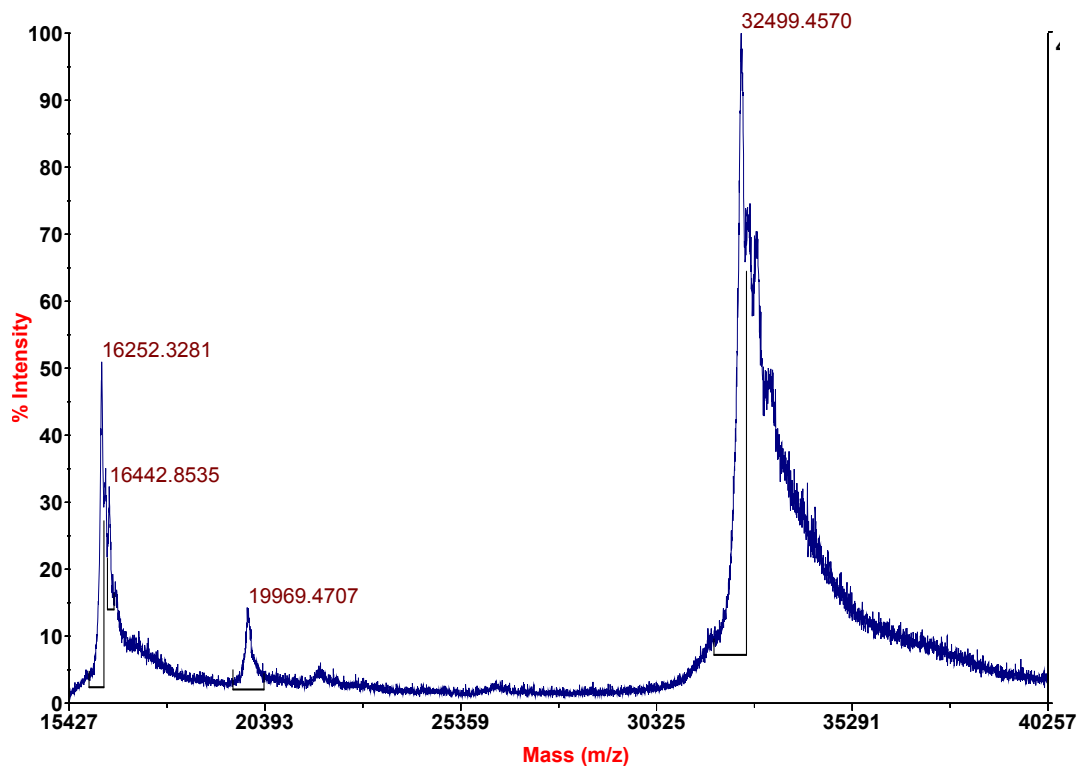


Figura 3.28. MALDI-TOF de peso molecular de la peroxidasa de *G. biloba*.

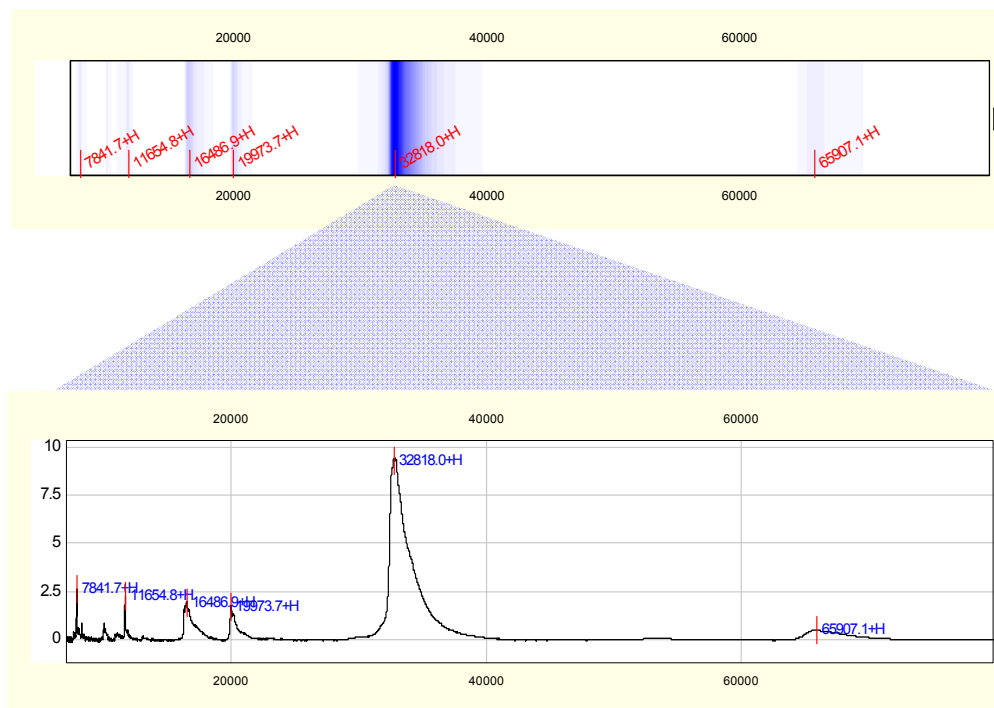
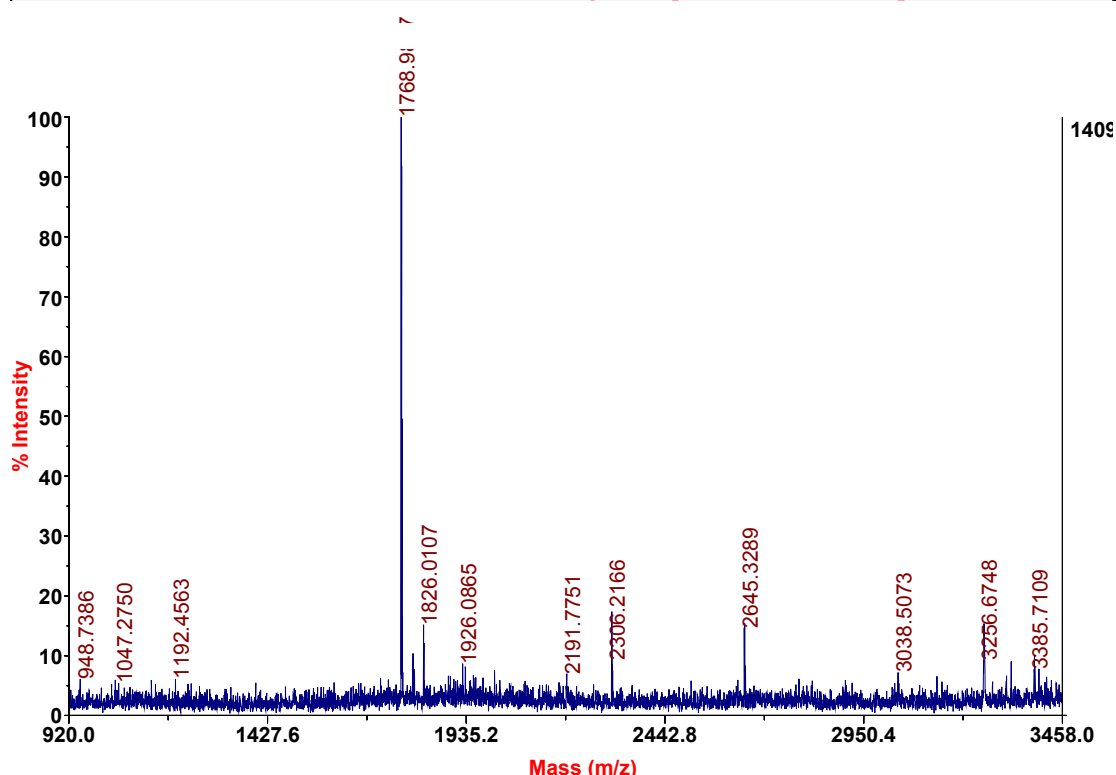


Figura 3.29. SELDI-TOF de la peroxidasa purificada de *G. biloba*.

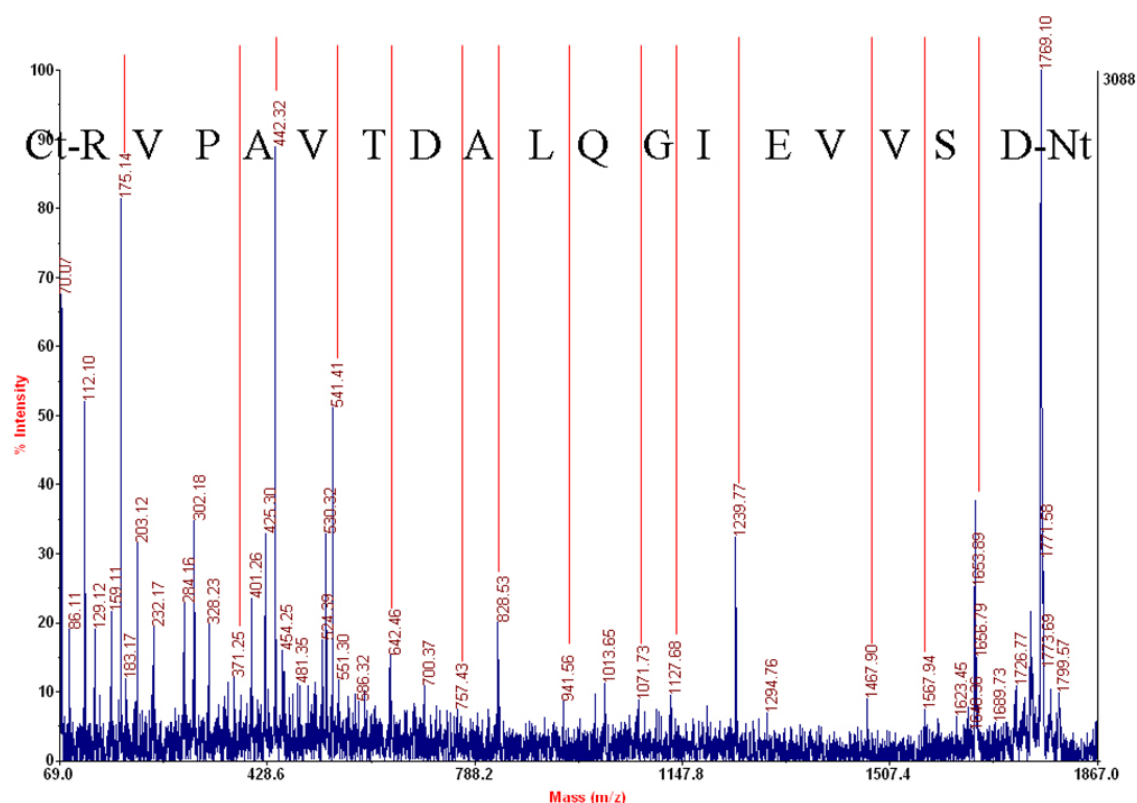
Que la peroxidasa de *G. biloba* es una peroxidasa de clase III se confirmó a través de la secuenciación parcial de la proteína que incluyó la secuenciación del extremo N-terminal y la secuenciación de algunos fragmentos trípticos. La secuenciación N-terminal directa de esta peroxidasa mediante la degradación de Edman no reveló ningún resultado, probablemente debido al bloqueo del extremo N-terminal de esta peroxidasa. Este resultado era de esperar, ya que la mayor parte de las peroxidases vegetales de clase III sufren modificaciones post-traduccionales (Hirano y cols. 1993), que incluyen la formación de un residuo N-terminal de piro-glutamato (Z) a partir de una Gln/Glu terminal. Por este motivo, se procedió a desbloquear el extremo N-terminal con piroglutamato aminopeptidasa. El desbloqueo del extremo N-terminal de la peroxidasa con piroglutamato aminopeptidasa mostró una secuencia de aminoácidos (Tabla 3.28) en la que la leucina es el primer aminoácido, y que forma parte de la secuencia LSXTFY, la cual está muy conservada en las peroxidases de clase III (Tyson y Dhindsa 1995).

**Tabla 3.28.** Secuencia N-terminal de la peroxidasa de *G. biloba* y de la peroxidasa de *Z. elegans* (Gabaldón y cols. 2005). X = aminoácido no determinado mediante la degradación de Edman. Los aminoácidos consenso están marcados en rojo.

Peroxidasa	Secuencia N-terminal
Prx <i>G. biloba</i>	-LSPTFYATSXPNVXXTR
Prx <i>Z. elegans</i>	ELSTTFYDTTXP TALSTI



**Figura 3.30.** Huella peptídica obtenida de los fragmentos trípticos de la peroxidasa de *G. biloba*.



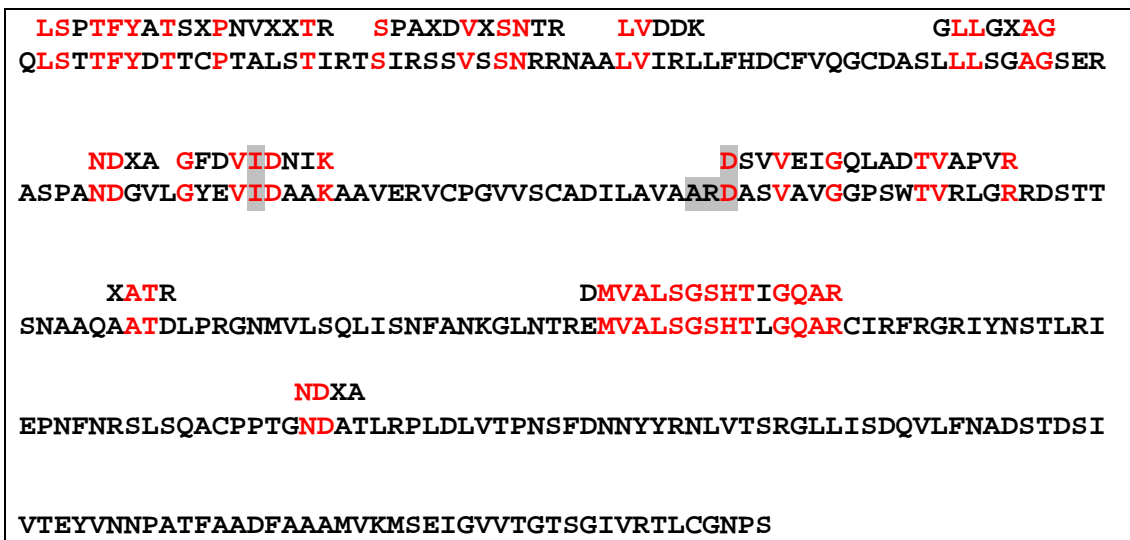
**Figura 3.31.** Espectro MS/MS del péptido tríptico de  $m/z = 1768,98$ , proveniente de la digestión de la peroxidasa de *G. biloba*, y su secuenciación manual *de novo*.

El siguiente paso fue la determinación de la huella peptídica de la peroxidasa de *G. biloba* (Figura 3.30) y el análisis de la secuencia de algunos de sus fragmentos trípticos. Cuando se realizó una búsqueda del espectro obtenido de la huella peptídica (Figura 3.30) en las bases de datos, no se obtuvo resultado alguno. Este hecho sólo confirma que nuestra peroxidasa es una peroxidasa nueva, que no ha sido antes secuenciada ni clonada.

Cuando se procedió a la búsqueda de los fragmentos individuales solo se identificaron dos fragmentos trípticos en las búsquedas vía Mascot. Uno de ellos, correspondía a la secuencia GFDVIDNIK de  $m/z = 1019,52$ , presente en una peroxidasa de *Scutellaria baicalensis* (Anexo 3.1). El otro correspondía a la secuencia DMVALSGSHTIGQAR de  $m/z = 1541,76$ , presente en la peroxidasa de *O. sativa* (Anexo 3.2). El resto de los fragmentos se secuenciaron *de novo*, incluyendo el más abundante de la huella peptídica ( $m/z = 1768,98$ ), de secuencia DSVVEIGQLADTVAPVR (Figura 3.31). La secuenciación *de novo* del resto de fragmentos dio las siguientes secuencias parciales, [Q/K]ATR, SPA[Q/K]VD[L/I]SNTR, G[L/I][L/I]G[Q/K]AG, ND[F/M]A y [L/I]VDDK (Tabla 3.29). En el alineamiento manual (Figura 3.32), se puede observar la posible ubicación que tendrían estos fragmentos trípticos utilizando la peroxidasa de *Z. elegans* como plantilla. Se ha utilizado esta peroxidasa como plantilla por tratarse de una peroxidasa básica con propiedades catalíticas conocidas y demostrado su papel en los procesos de lignificación (Gabaldón y cols. 2005, 2006).

**Tabla 3.29.** Péptidos trípticos obtenidos por secuenciación *de novo* de la peroxidasa de *G. biloba*.

<b>Péptidos trípticos</b>
DSVVEIGQLADTVAPVR
[Q/K]ATR
SPA[Q/K]VD[L/I]SNTR
G[L/I][L/I]G[Q/K]AG
ND[F/M]A
[L/I]VDDK

**Figura 3.32.** Alineamientos de la secuencia N-terminal y de los fragmentos trípticos de la peroxidasa de *G. biloba* sobre la peroxidasa de *Z. elegans*, mostrando las homologías en color rojo. El sombreado en gris indica los determinantes estructurales de las siringil peroxididasas (Gómez-Ros y cols. 2007a)

Gómez-Ros y cols. (2007a) han establecido los determinantes estructurales de la siringil peroxididasas que no están presentes en las guaiacil peroxididasas. Como se puede ver en la figura 3.32 sombreado en gris en los fragmentos trípticos de *G. biloba* existen dos aminoácidos que coinciden con dichos determinantes estructurales que no aparecen en las peroxididasas tipo guaiacilo.

Cuando se alinearon entre sí las ocho peroxididasas de *G. biloba* descritas en la base de datos (PeroxiBase) y con los fragmentos obtenidos por digestión tríptica de la proteína purificada de *G. biloba*, los resultados (Figura 3.33) confirmaron que esta peroxidasa no ha sido antes ni purificada ni clonada.

```

GbPrx01 -----GTR----- 4
GbPrx02 -----
GbPrx03 -----
GbPrx04 -----
GbPrx05 -----
GbPrx06 -----VRILFLLMLMCALATTRACLRGFLKPDH 28
GbPrx07 -----
GbPrx08 -----

GbPrx01 ---SCPQAEDIIREQVGLLYKHKNTAFSWLRNIFHDCFVESCASLLLDSTRKSMSEK- 60
GbPrx02 -----
GbPrx03 -----ERIDFFLRQDITQAAGILRLHFHDCFVQGCASVLLDGSASGPSEQ- 46
GbPrx04 -----
GbPrx05 -----
GbPrx06 YQWTCPEAEAIVFAGVEKAVAQEARMAASLLRLHFHDCFVNGCDASVLLDDTVFFTGK 88
GbPrx07 -----
GbPrx08 -----

          G--FDVIDNIK          DSVVEIGQLADTVAPVR
GbPrx01 ETDRSFGLRN--FRYLDTIKEAVERECPGVVSCADILVLSARDGVVSLGGPFIPLKTGR 118
GbPrx02 -----
GbPrx03 DAPPNLTLRPKAFEIIDDIKKNVDAICSKTVSCADITALATRESVKKAGGPTYRVPLGR 106
GbPrx04 -----DSVVLTGGPSWVQMGRR 18
GbPrx05 -----
GbPrx06 ATPNANSLRG--FEVIDSIKEELEFLCPGTVSCADILATAARDSV----- 131
GbPrx07 -----
GbPrx08 -----

          DMVALSGSHTIGQAR
GbPrx01 DGRK-SRANVEDHLPDHNESISTVLSRFQAIGIDTPGVVALLGAHSVGRTHCVKLVHRL 177
GbPrx02 -----PGPRSNATALIKAFQSKSLDTTDLVALSGGHTIGIGHCSSFTNRL 45
GbPrx03 DGLTFATRNVTLANLPGPRSNVTALIKAFQSKSLDTTDLVALSGGHTIGIGHCSSFTNRL 166
GbPrx04 DSLTASKVTANNN-IPAPSSNVATLISKFQNVGLTDEDMVTLSGAHTIGKARCSTFNRL 77
GbPrx05 -----LPTVNMTVDQLTSLFRSKGLSQADMVTLSGGHTVGFACNEFMYRI 46
GbPrx06 -----
GbPrx07 -----KCP----- 3
GbPrx08 -----

GbPrx01 YPEVDPTLDAAHADYMKWKP---DAIPNPKAVQYVRNDRGTPMKLDNNYYRNLM---NK 232
GbPrx02 YPTQATSLNEFAQSLYR-----ICPTSTTNSTTDLVTRTPNVFDNKYYVDLVQ--NQ 96
GbPrx03 YPTQATSLNEFAQSLYR-----ICPTSTTNSTTDLVTRTPNVFDNKYYVDLVQ--NQ 217
GbPrx04 LNQAGTGSPDPTLQKFLTSLQQLCLERVNNNNTVTVLDLETPLTFDNQYYQNLAS--GE 135
GbPrx05 YNFNKTYDIDPTMNPKYAMRLRASCPRDGFDPTVVAFNVDVSTPTAFDNAYYQNAQR--GL 104
GbPrx06 -----
GbPrx07 -----RSGGDNKITPLDLVSPITTFDTHYYLNLES--GR 34
GbPrx08 -----K 1

GbPrx01 GLLIVDQQLYDD--PRTKRYVKMAKSQDYFFQHFARALTILSENNPLTGTKGEIRKQCS 290
GbPrx02 VLFTSDQTLTLLN--SETKKIVESFASNQTLFFQKFRAMIKMGQVSVLTGKQGEVRANCF 154
GbPrx03 VLFTSDQTLTLLN--SET----- 232
GbPrx04 GLLNSDQVLFSS--GGNTKQLVEYYIQNQEAFDNEFKTSMIRMGNIQPLTGTGDIERRNCR 194
GbPrx05 ALLATDQLLFAD--IRTRGVNSFAKSKQTFNNSFVASMIRLGNVGVKTGNQGEIRRDCG 162
GbPrx06 -----
GbPrx07 GLLNSDQILYSTKGSETKALVKYYATHTEAFFHQFAISMINMGNITPLTGSRGEIRKNCR 94
GbPrx08 GLLHSDQELFNG--GSTVSVQVNSSASNSKSFDTDFACAMVKMGNIKPLTGTNGQIRSNCR 59

GbPrx01 MPNKLHGAQR----- 300
GbPrx02 ARNPTSYSVISTVVDEIVGVEDALSAM 183
GbPrx03 -----
GbPrx04 FIN----- 197
GbPrx05 VFN----- 165
GbPrx06 -----
GbPrx07 KMN----- 97
GbPrx08 KP----- 61

```

Figura 3.33. Alineamiento de las peroxidasa secuenciadas de *G. biloba* descritas en la base de datos, PeroxiBase (Bakalovic y cols. 2006), y de los péptidos trípticos obtenidos de la peroxidasa de *G. biloba*, señalando en color rojo las homologías.

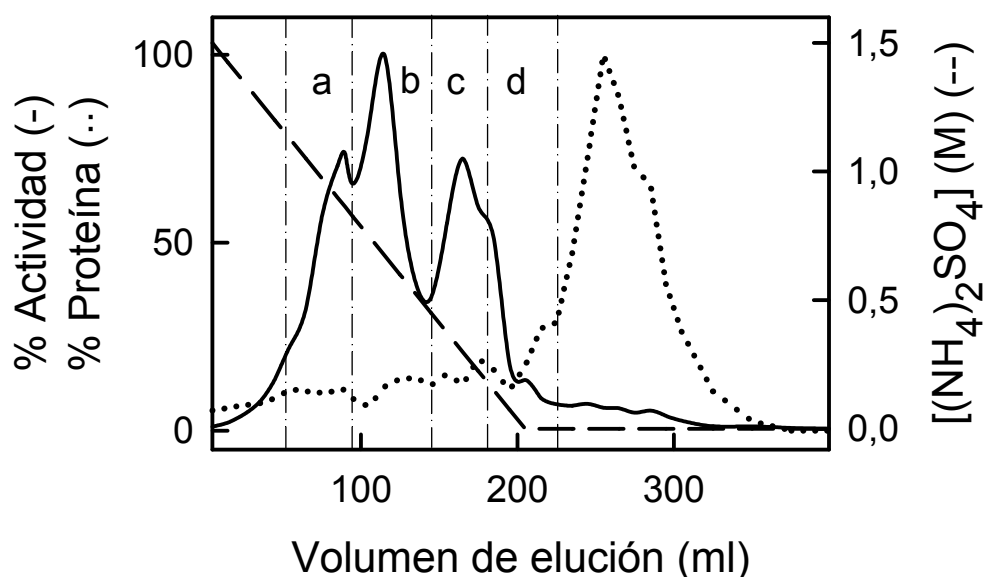
Al igual que el tratamiento de la peroxidasa con  $\text{HgCl}_2$ , las propiedades catalíticas confirman que la peroxidasa de *G. biloba* es de alto espín. Así, la peroxidasa de *G. biloba* es capaz de oxidar tanto los alcoholes como los aldehídos *p*-hidroxicinámlicos, y aunque presenta una mayor capacidad para oxidar el alcohol coniferílico y el coniferilaldehído, es también capaz de oxidar el alcohol sinapílico y el sinapilaldehído (Tabla 3.30). De estos resultados, puede deducirse que la peroxidasa de *G. biloba* es una peroxidasa mezcla de tipo guaiacilo-siringilo, en contraste con la peroxidasa de *Z. elegans*, que es de tipo siringilo, dato apoyado por los determinantes estructurales típicos de las siringil peroxidases (Figura 3.32).

**Tabla 3.30.** Actividad catalítica de la peroxidasa de *G. biloba* frente a diferentes sustratos y actividad peroxidasa relativa, expresada dando el valor 1 a la obtenida frente a 4-MN.

<b>Sustratos</b>	<b><i>k</i>catalítica (moles<math>\text{Ss}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{E}</math>)</b>	<b>Actividad peroxidasa relativa</b>
4MN	8,17 ± 0,69	1
Alcohol <i>p</i> -cumarílico	13,12 ± 0,05	1,61
Alcohol coniferílico	40,27 ± 1,69	4,93
Alcohol sinapílico	0,45 ± 0,10	0,06
<i>p</i> -Cumarilaldehído	1,22 ± 0,25	0,15
Coniferilaldehído	23,93 ± 1,63	2,93
Sinapilaldehído	0,64 ± 0,20	0,08

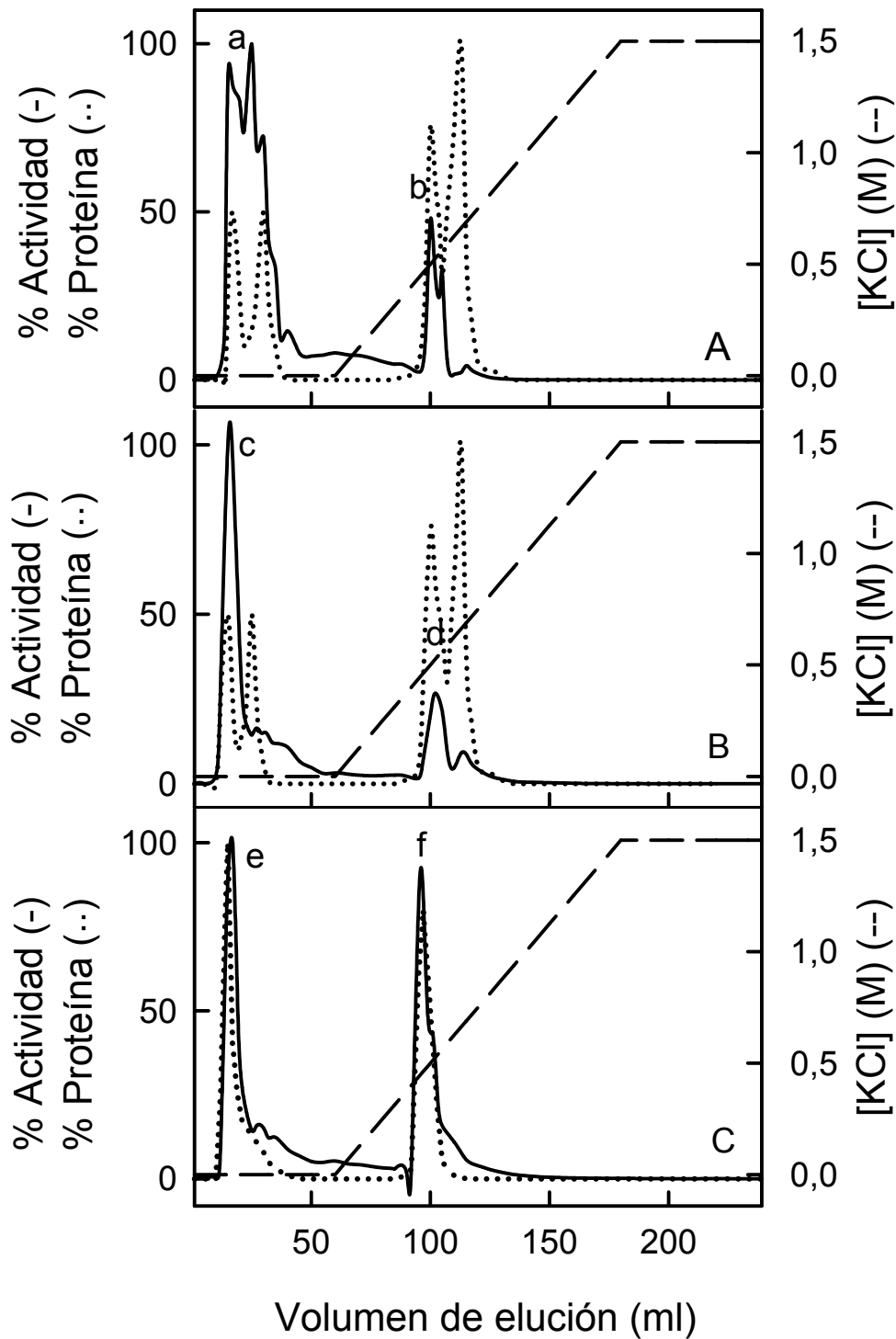
### V.3. Purificación y caracterización de las peroxidasas del proteoma extracelular de *C. revoluta*

El protocolo a seguir fue similar a los protocolos descritos anteriormente para la purificación de las peroxidasas de *B. pendula* y *G. biloba* y, para ello, tras precipitar la proteína con sulfato amónico al 95% de saturación se procedió a su cromatografía hidrofóbica. En esta cromatografía (Figura 3.34), la mayor parte de la peroxidasa eluyó en 4 picos: el primero comprendió hasta los 95 ml (Figura 3.34, pico a); el segundo (Figura 3.34, pico b), y mayoritario, entre los 96 y 135 ml; el tercero (Figura 3.34, pico c), entre los 136 y 180 ml y el cuarto (Figura 3.34, pico d) entre los 181 y 215 ml. Debido a la semejanza del patrón de isoenzimas de peroxidasas y de proteínas, los dos primeros picos (a y b) se juntaron. Este paso supuso una considerable reducción de la proteína total, enriqueciéndose la peroxidasa, lo que se aprecia en el aumento del Rz (Tablas 3.32, 3.33 y 3.34).



**Figura 3.34.** Cromatografía hidrofóbica sobre Fenil-Sepharosa™ 6 Fast Flow de la proteína extracelular de las suspensiones celulares de *C. revoluta*.





**Figura 3.35.** Cromatografía aniónica sobre Q Sepharosa™ Fast Flow de las peroxidasas purificadas por cromatografía hidrofóbica, pico ab (A), pico c (B) y pico D (C).

Cada una de las tres fracciones (ab, c y d) obtenidas en la cromatografía hidrofóbica se sometió a una nueva cromatografía de intercambio aniónico (Figura 3.35). La fracción ab obtenida en la cromatografía hidrofóbica estaba compuesta exclusivamente de peroxidasas

ácidas, que al recromatografiarlas en una resina de intercambio aniónico se separaron en dos picos: el primero (Figura 3.35A, pico a) no quedó retenido por la columna; mientras que el segundo (Figura 3.35A, pico b) eluyó entre 95 y 110 ml. Al recromatografiar el pico c de la cromatografía hidrofóbica se obtuvieron dos fracciones de peroxidasa, una no quedó retenida en la columna (Figura 3.35B, pico c) y la otra (Figura 3.35B, pico d) eluyó entre 95 y 130 ml. El pico c constituye la peroxidasa CrPrx2, que tiene *pI* básico (Tabla 3.31, Figura 3.40). Este paso supuso un considerable aumento del *Rz*, pasando de 1,00 a 1,53, pudiendo considerarse pura (Tabla 3.37). La última fracción de peroxidasas de la cromatografía hidrofóbica (Figura 3.34, pico d) se recromatografió en una columna aniónica, resultando en la elución de dos picos, el primero (Figura 3.35C, pico e) no quedó retenido por la columna, mientras que el segundo (Figura 3.35C, pico f) eluyó entre 90 y 130 ml. El pico e estaba constituido por una peroxidasa de *pI* básico (Figura 3.40), pura en función del SDS-PAGE (Figura 3.38) y de *Rz*>3, denominada CrPrx3 (Tabla 3.31). Las peroxidasas de los picos a, b, d y f de las distintas cromatografías aniónicas fueron de carácter ácido, y tuvieron un patrón proteico e isoenzimático semejante, por lo que se juntaron en una misma fracción, denominada CrPrx1 (Tabla 3.31). Tras juntar las peroxidasas el *Rz* disminuyó de 0,74 a 0,29 (Tabla 3.32).

Con este protocolo de purificación se consiguieron purificar dos fracciones de peroxidasas básicas y de peroxidasas ácidas. En las tablas 3.31, 3.32, 3.33 y 3.34 se resumen los pasos seguidos en el proceso de purificación de las distintas peroxidasas y los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

**Tabla 3.31.** Fracciones de peroxidasa de *C. revoluta* obtenidas en la cromatografía aniónica (Figura 3.35) y la nomenclatura asignada a cada una de ellas.

<b>Nombre peroxidasa</b>	<b><i>pI</i></b>	<b>Fracciones de peroxidasa correspondiente</b>
CrPrx1	Ácido	Picos a,b,d y f
CrPrx2	Básico	Pico c
CrPrx3	Básico	Pico e

**Tabla 3.32.** Tabla de purificación de las peroxidasas CrPrx1 de *C. revoluta*. La actividad peroxidasa se midió usando TMB como sustrato.

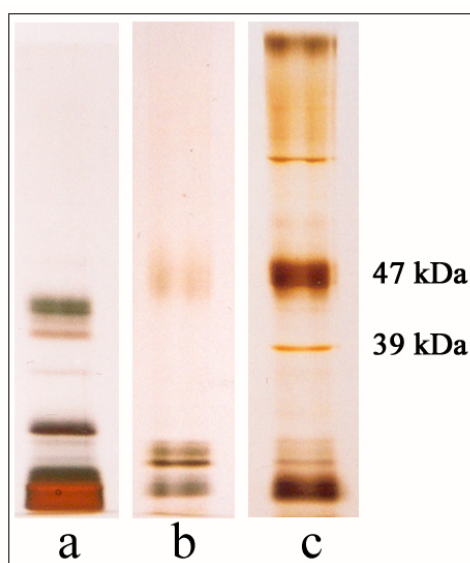
<b>Etapas</b>	<b>Actividad peroxidasa total (nkat)</b>	<b><i>Rz</i></b>
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	65600	0,15
Phenil Sepharosa	7805	0,74
Q Sepharosa	2666	0,29

**Tabla 3.33.** Tabla de purificación de la peroxidasa CrPrx2 de *C. revoluta*. La actividad peroxidasa se midió usando TMB como sustrato.

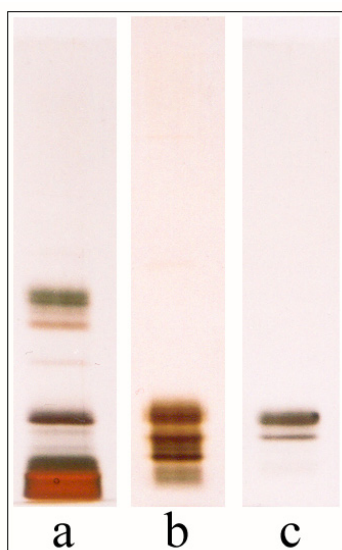
<i>Etapa</i>	<i>Actividad peroxidasa total (nkat)</i>	<i>Rz</i>
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	65600	0,15
Phenil Sepharosa	2234	1,00
Q Sepharosa	239	1,53

**Tabla 3.34.** Purificación de la peroxidasa CrPrx3 de *C. revoluta*. La actividad peroxidasa se midió usando TMB como sustrato.

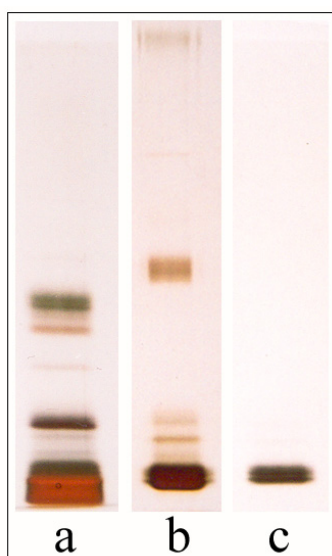
<i>Etapa</i>	<i>Actividad peroxidasa total (nkat)</i>	<i>Rz</i>
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	65600	0,15
Phenil Sepharosa	879	0,18
Q Sepharosa	117	>3



**Figura 3.36.** Análisis mediante SDS-PAGE, después de teñir con nitrato de plata, de las diferentes etapas de purificación de la peroxidasa CrPrx1. Proteína extracelular de suspensiones celulares (a). Proteína purificada por cromatografía hidrofóbica (b). Proteína purificada por cromatografía de intercambio iónico (c).

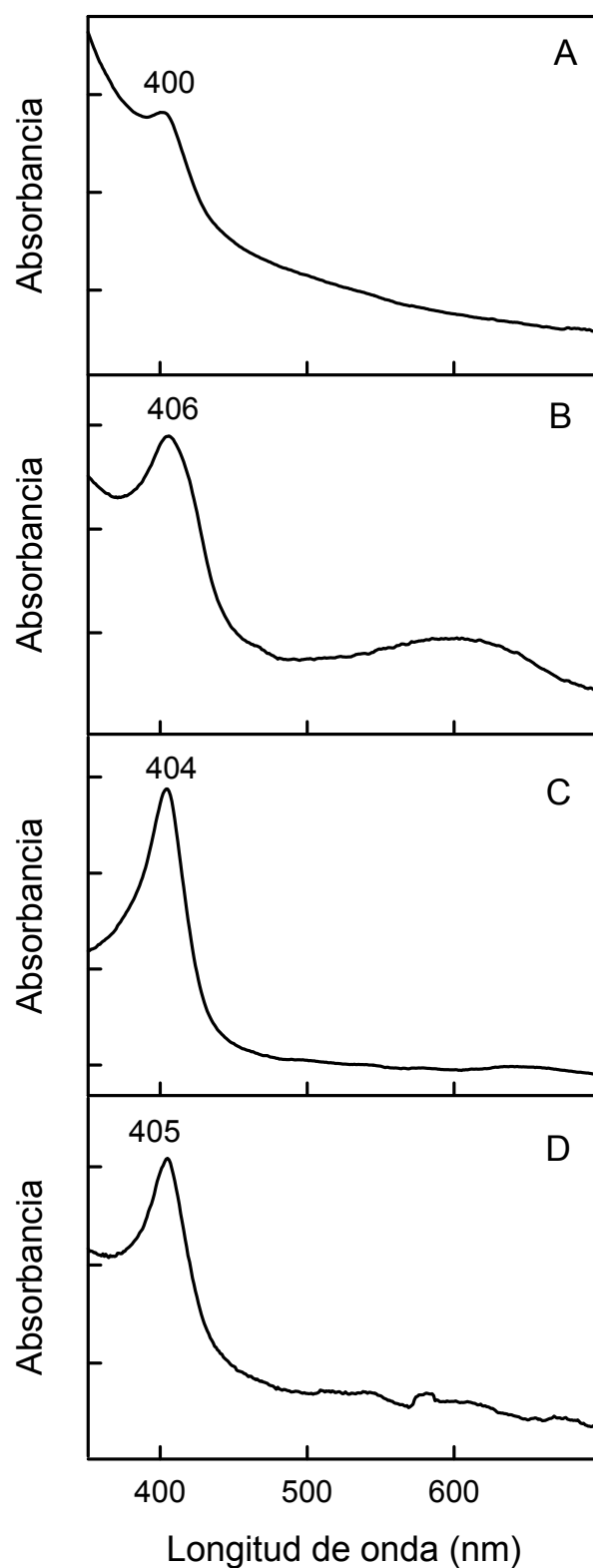


**Figura 3.37.** Análisis mediante SDS-PAGE, después de teñir con nitrato de plata de las diferentes etapas de purificación de la peroxidasa CrPrx2. Proteína extracelular de suspensiones celulares (a). Proteína purificada por cromatografía hidrofóbica (b). Proteína purificada por cromatografía de intercambio iónico (c).

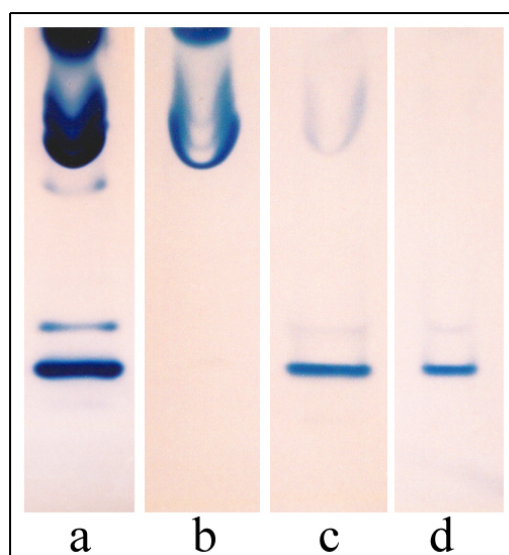


**Figura 3.38.** Análisis mediante SDS-PAGE, después de teñir con nitrato de plata, de las diferentes etapas de purificación de la peroxidasa CrPrx3. Proteína extracelular de suspensiones celulares (a). Proteína purificada por cromatografía hidrofóbica (b). Proteína purificada por cromatografía de intercambio iónico (c).

El espectro de absorción visible (Figura 3.39) de las peroxidosas purificadas mostró que todas ellas son de alto espín, presentando la banda de Soret a 406 nm (peroxidasa CrPrx1), a 404 nm (peroxidasa CrPrx2) y a 405 nm (peroxidasa CrPrx3).



**Figura 3.39.** Espectro de absorción visible de la proteína extracelular precipitada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (A), de CrPrx1 (B), de CrPrx2 (C) y de CrPrx3 (D), indicando el máximo de absorción de la banda Soret.



**Figura 3.40.** Patrón isoenzimático obtenido por isoelectroenfoque bajo condiciones de no-equilibrio de la peroxidasa extracelular de *C. revoluta* (a), de CrPrx1 (b), de CrPrx2 (c), y de CrPrx3 (d), después de teñir con 4-MN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para confirmar la naturaleza peroxidasa de las proteínas purificadas, se procedió a la obtención de los fragmentos trípticos y la secuenciación parcial de los mismos.

#### *Secuenciación parcial de los fragmentos trípticos de las peroxidosas ácidas*

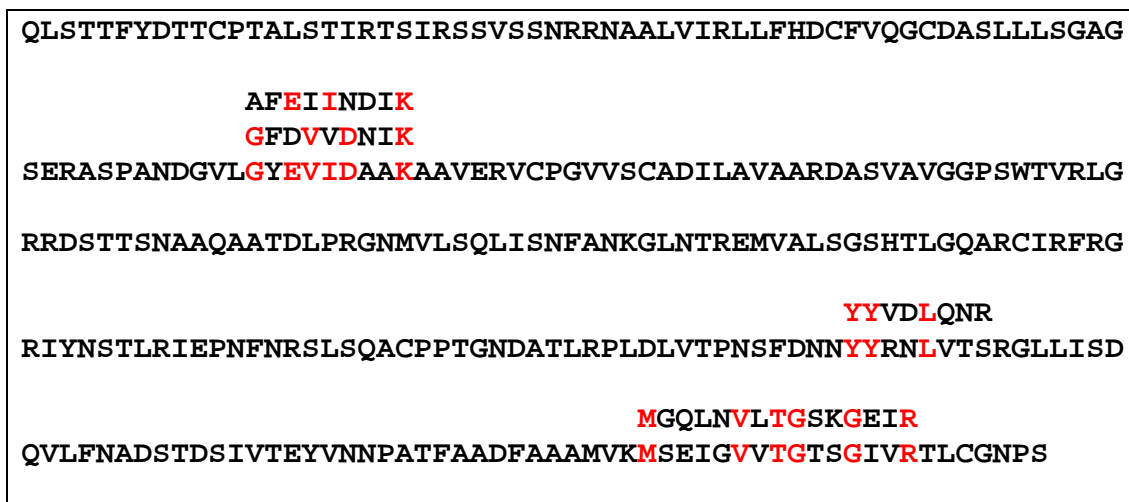
Debido a que no se consiguió purificar a homogeneidad las peroxidosas ácidas (CrPrx1), se procedió a separar las proteínas en un gel de SDS-PAGE y a recortar las bandas de interés para su posterior secuenciación tríptica. La proteína de 47 kDa (Figura 3.36) dio varios fragmentos trípticos que se identificaron en las búsquedas vía Mascot (Tabla 3.35). El fragmento tríptico YYVDLQNR de  $m/z = 1069,52$  (Anexo 3.3) está presente en una peroxidasa de *Oryza sativa*; el fragmento tríptico GFDVVDNIK de  $m/z = 1005,51$  (Anexo 3.4) forma parte de una peroxidasa de *Ipomoea batatas*; y los fragmentos trípticos AFEIINDIK de  $m/z = 1061,58$  (Anexo 3.5) y MGQLNVLTGSKGEIR de  $m/z = 1617,85$  (Anexo 3.5) se encuentran en una peroxidasa de *Picea abies*.

La proteína de 39 kDa (Figura 3.36) mostró el fragmento tríptico GFDVVDNIK de  $m/z = 1005,51$  (Anexo 3.8), presente en una peroxidasa de *I. batatas*.

**Tabla 3.35.** Relación de los fragmentos trípticos obtenidos de la CrPrx1 de *C. revoluta* junto con las especies y su número de acceso en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

<b>Peroxidasa</b>	<b>Fragmento tríptico</b>	<b>Especie</b>	<b>Nº acceso</b>
CrPrx1a (47 KDa)	YYVDLQNR	<i>O. sativa</i>	CAH69262.1
	GFDVVDNIK	<i>I. batatas</i>	CAB94692.1
	AFEIINDIK	<i>P. abies</i>	CAD92856.1
	MGQLNVLTGSKGEIR	<i>P. abies</i>	CAD92856.1
CrPrx1b (39 KDa)	GFDVVDNIK	<i>I. batatas</i>	CAB94692.1

Estos resultados sugieren que las proteínas de 47 kDa y de 39 kDa son peroxididasas, ya que todos los fragmentos encontrados pertenecen a peroxididasas de clase III. Sin embargo, la proteína de 47 kDa no está constituida por una única peroxidasa, puesto que dos de los fragmentos trípticos obtenidos de ella alinean en la misma zona de la peroxidasa de *Z. elegans* (Figura 3.41).



**Figura 3.41.** Alineamientos de los fragmentos trípticos de las peroxididasas ácidas de *C. revoluta* sobre la peroxidasa de *Z. elegans*, mostrando las homologías en color rojo.

#### Secuenciación parcial de CrPrx2

Para confirmar la naturaleza peroxidasa de CrPrx2 se procedió a la secuenciación parcial de la proteína. Sin embargo, la secuenciación N-terminal directa de esta peroxidasa básica mediante la degradación de Edman no reveló ningún resultado, a pesar de estar desbloqueado el extremo N-terminal con piroglutamato aminopeptidasa.

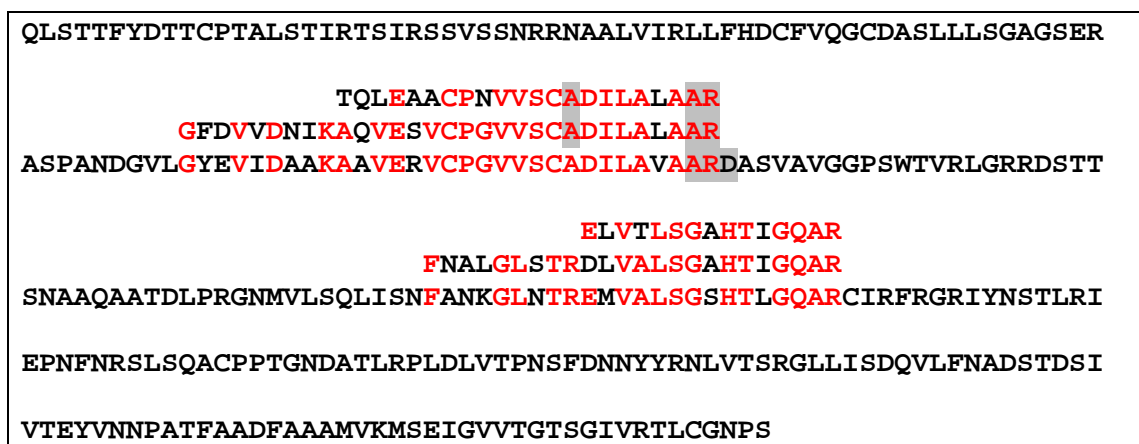
Por este motivo, el siguiente paso fue la digestión tríptica y el análisis de la secuencia de algunos de los fragmentos trípticos de esta proteína. A diferencia de CrPrx1, CrPrx2 se procesó directamente, sin necesidad de recortar las bandas del gel SDS-PAGE puesto que la proteína muestra un alto grado de purificación (Figura 3.37). Cuando se procedió al análisis de los fragmentos trípticos procedentes de su digestión se identificaron varios de ellos en las búsquedas vía Mascot (Tabla 3.36). Así, los fragmentos trípticos GFDVVDNIK de  $m/z = 1005,51$  (Anexo 3.6) y FNALGLSTRDLVALSGAHTIGQAR de  $m/z = 2467,33$  (Anexo 3.6) están presentes en una peroxidasa de *Gossypium hirsutum*. También se identificó el fragmento tríptico TQLEAACPNVVSCADILALAAR de  $m/z = 2342,17$  (Anexo 3.7), presente en una peroxidasa básica de *Stylosanthes humilis*; el fragmento tríptico ELVTLGAHTIGQAR de  $m/z = 1551,84$  (Anexo 3.8) presente en otra peroxidasa básica de *S. humilis*; y el fragmento tríptico AQVESVCPGVVSC de  $m/z = 2285,15$  (Anexo 3.9), presente en una peroxidasa de *Spinacia oleracea*.

**Tabla 3.36.** Relación de los fragmentos trípticos obtenidos de CrPrx2 y CrPrx3 junto con las especies y su número de acceso en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

<b>Fragmento tríptico</b>	<b>Especie</b>	<b>Nº acceso</b>
GFDVVDNIK	<i>G. hirsutum</i>	AAP76387
FNALGLSTRDLVALSGAHTIGQAR	<i>G. hirsutum</i>	AAP76387
TQLEAACPNVVCADILALAAR	<i>S. humilis</i>	AAB67737.1
ELVTLSGAHTIGQAR	<i>S. humilis</i>	AAB02554.1
AQVESVCPGVVSC	<i>S. oleracea</i>	CAA71494

#### Secuenciación parcial de CrPrx3

Al igual que sucedió con CrPrx2, la secuenciación N-terminal directa de esta peroxidasa mediante la degradación de Edman no reveló ningún resultado, a pesar de estar desbloqueado el extremo N-terminal con piroglutamato aminopeptidasa. Por lo tanto, se llevó a cabo una secuenciación parcial de la proteína mediante su digestión tríptica, a partir de la proteína soluble. Los fragmentos trípticos resultantes de dicha digestión fueron los mismos que los encontrados en la digestión de CrPrx2 (Tabla 3.36). En el alineamiento manual (Figura 3.42), se puede observar la posible ubicación que tendrían los fragmentos trípticos obtenidos de la digestión de las peroxidases básicas, CrPrx2 y CrPrx3, utilizando la peroxidasa de *Z. elegans* como plantilla.

**Figura 3.42.** Alineamientos de los fragmentos trípticos de CrPrx2 y CrPrx3 de *C. revoluta* sobre la peroxidasa de *Z. elegans*, mostrando las homologías en color rojo. El sombreado en gris indica los determinantes estructurales de las siringil peroxidases (Gómez-Ros y cols. 2007a)

El hecho de que varios fragmentos trípticos de estas proteínas alineen en la misma zona de una secuencia consenso indica que las proteínas no son puras a homogeneidad, y que en realidad, tanto CrPrx2 como CrPrx3, son una mezcla de peroxidases de idéntico peso molecular e idéntico pl, y por lo tanto, de difícil separación. La acción fallida a la hora de secuenciar el extremo N-terminal no hace sino confirmar dicha afirmación, ya que esta secuenciación no es posible cuando existe mezcla de proteínas. Estos resultados también sugieren que si bien CrPrx2 es una mezcla de al menos dos peroxidases, CrPrx3 es el



resultado del procesamiento parcial de CrPrx2, ya que, presentando diferente peso molecular, muestra los mismos fragmentos trípticos y un mismo pI que CrPrx2. El valor de  $R_z > 3$  obtenido para CrPrx3 está de acuerdo con esta hipótesis de trabajo.

En las bases de datos analizadas (NCBI, PeroxiBase) no se ha descrito ningún fragmento de peroxidasa de *Cycas revoluta*. Tan sólo se encontraron seis secuencias parciales y una completa de peroxidasas de *C. rumphii*. Con el fin de buscar alguna homología por tratarse de especies del mismo género, se alinearon los fragmentos trípticos de CrPrx2 con la peroxidasa completa de *C. rumphii* (Figura 3.43). Los resultados mostraron que las homologías no son mayores con una peroxidasa de una especie del mismo género que con otra muy alejada en la escala filogenética como es *Z. elegans*.

```

MALRVLVLCVVSLVVFVGRNGVEGSGLVMMNFIVREQVRLLYKRHKNTAFSWLRNIFHDCF
                                     AQVESVCPGVVSCADILALAA
                                     GFDVVDNIKTQLEAACPNVVSCADILALAA
VESCASLLLDSTRKSMSEKETDRSFGLRNFKYLDTIKEAVERECPGVVSCADILVLSA
R                                                                           ELVT
R                                                                           FNALGLSTRDLVA
RDGIVSLGGPYIPLKTGRRDGRKSRANVVENYLPDHNSISTVLSRFADIGIDTPGVVA
LSGAHTIGQAR
LSGAHTIGQAR
LLGAHSVGRTHCVKLVHRLYPDVPDPTLDPAAHEMKWKCPDAIPNPKAVQYVRNDRGTP
MKLDNNYYRNLNEMKGLLIVDQQLYADSRTRRHVKKMAKDQGYFFTHFARALAILSENN
PLTGTRGEIRKHCSVNKLH

```

**Figura 3.43.** Alineamientos de los fragmentos trípticos de CrPrx2 y CrPrx3 de *C. revoluta* sobre la peroxidasa de *C. rumphii*, mostrando las homologías en color rojo.

Después de comprobar mediante la secuenciación parcial de las proteínas que CrPrx1, CrPrx2 y CrPrx3 son peroxidasas, se estudiaron sus propiedades catalíticas. Todas las peroxidasas purificadas son capaces de oxidar los tres alcoholes *p*-hidroxicinámilicos (Tabla 3.37), lo que confirma el papel de estas proteínas en la lignificación.

**Tabla 3.37.** Actividad catalítica de las peroxididasas de *C. revoluta* frente a diferentes sustratos.

<b>Sustratos</b>	<b><i>k</i>catalítica (molesSs<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup> E)</b>		
	CrPrx1	CrPrx2	CrPrx3
4MN	44,5 ± 3,5	3,9 ± 0,2	5,1 ± 0,4
TMB	193,9 ± 24,8	26,2 ± 2,0	22,1 ± 1,0
Alcohol <i>p</i> -cumarílico	54,3 ± 2,4	11,9 ± 0,4	12,0 ± 0,4
Alcohol coniferílico	249,4 ± 30,3	25,1 ± 1,6	19,8 ± 3,1
Alcohol sinapílico	3,9 ± 0,5	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1

Las afinidades de las peroxididasas por los distintos sustratos son diferentes; sin embargo, lo más destacable es la mayor afinidad que presentan las peroxididasas básicas (CrPrx2 y CrPrx3) hacia el alcohol sinapílico (Tabla 3.38). La capacidad diferencial de las peroxididasas básicas de oxidar el alcohol sinapílico frente a las ácidas está ampliamente descrita en la bibliografía (Bernards y cols. 1999, Ros Barceló y cols. 2000), ya que en éstas últimas la oxidación del alcohol sinapílico está aparentemente dificultada estéricamente (Østergaard y cols. 2000, Ros Barceló y cols. 2007).

**Tabla 3.38.** Actividad enzimática relativa de las peroxididasas purificadas de *C. revoluta* frente a diferentes sustratos, expresada dando el valor 1 a la obtenida frente a 4-MN.

<b>Sustratos</b>	<b>Actividad peroxidasa relativa</b>		
	CrPrx1	CrPrx2	CrPrx3
4MN	1	1	1
TMB	4,36	6,72	4,33
Alcohol <i>p</i> -cumarílico	1,22	3,05	2,35
Alcohol coniferílico	5,60	6,44	3,88
Alcohol sinapílico	0,09	0,31	0,20

A la vista de todos estos resultados, las peroxididasas básicas purificadas de dos gimnospermas basales, *G. biloba* y *C. revoluta*, son capaces de oxidar unidades S, lo que sugiere que la capacidad de oxidar el alcohol sinapílico fue adquirida por las plantas antes de la divergencia entre las angiospermas y las gimnospermas, y que se mantiene en los cultivos *in vitro*.





*Conclusiones*



i) El fraccionamiento subcelular de la actividad peroxidasa presente en callos de *B. pendula* y *G. biloba*, en la oscuridad y en la luz, revela que la mayor parte de la actividad se encuentra en la fracción soluble, estando el resto de la actividad peroxidasa asociada iónicamente a la membrana y a la pared celular. Esta actividad peroxidasa es mayor en callos mantenidos a la oscuridad que en callos mantenidos a la luz, y la máxima actividad se presenta durante la tasa máxima de crecimiento. La mayor actividad peroxidasa se presenta usando alcohol coniferílico como sustrato, aunque estas peroxidases son capaces de oxidar grupos siringilo como lo demuestra el hecho que de tanto el alcohol sinapílico como la siringaldazina pueden ser sustratos de las enzimas.

ii) Las suspensiones celulares de *B. pendula* y *G. biloba* presentan una curva de crecimiento de tipo sigmoide. La actividad peroxidasa presente en el medio extracelular de dichas suspensiones muestra un máximo de actividad desfasado con respecto a la tasa máxima de crecimiento celular. Las peroxidases, aunque muestran mayor afinidad por el alcohol coniferílico, son también capaces de oxidar el alcohol sinapílico y la siringaldazina. Al realizar un isoelectroenfoque de las peroxidases se reduce el número de isoenzimas con respecto a la fracción soluble de los callos, y no aparecen diferencias a lo largo del desarrollo.

iii) Las suspensiones celulares de *B. pendula*, *G. biloba* y *C. revoluta* se caracterizan por presentar lignificación en sus paredes celulares. Se observaron diferencias en la presencia de grupos siringilo en las gimnospermas estudiadas, indicando que tienen el potencial de sintetizar estos grupos pero que su síntesis está reprimida, indicando una fuerte regulación de la lignificación. Al comparar las ligninas de tallos jóvenes y suspensiones celulares, la cantidad de unidades H aumentaba significativamente en las muestras procedentes de los cultivos celulares. La relación entre monómeros  $\beta$ -O-4 y O-4 es mayor en tallos jóvenes que en suspensiones celulares, indicando que las ligninas están más ramificadas en los cultivos celulares. Estos datos sugieren que las ligninas de los cultivos celulares son similares a las de las paredes celulares primarias, y validan los cultivos celulares como herramienta de estudio de la lignificación de la pared celular primaria.

iv) El proteoma extracelular de cultivos celulares de *B. pendula*, *G. biloba* y *C. revoluta*, muestra la presencia universal de peroxidases capaces de oxidar los alcoholes cinamílicos a ligninas, junto con otras proteínas, como las lacasas, las glucanasas, las quitinasas, las protein kinasas y las proteínas de dedos de zinc, que son también proteínas que intervienen en la formación de la pared celular secundaria y la xilogénesis, y que se expresan diferencialmente durante el proceso de lignificación de las paredes celulares, tanto primarias como secundarias.

v) Todos los cultivos celulares secretaron al medio peroxidasas análogas y/o homólogas a la peroxidasa de *Z. elegans*. Estas proteínas/peroxidasas además fueron las mayoritarias en el proteoma de la pared celular de estos cultivos celulares, y están presentes, en mayor o menor extensión, en los fluidos intercelulares de los tallos jóvenes de las diferentes especies. Además, la afinidad de las peroxidasas del medio extracelular de suspensiones de *B. pendula* y del apoplasto por diferentes sustratos son muy semejantes, lo que sugiere que son sistemas comparables.

vi) Se ha purificado y se caracterizado molecularmente la proteína más abundante en el proteoma extracelular de *G. biloba*, un fósil viviente. Esta proteína resultó ser una peroxidasa de clase III con propiedades moleculares y catalíticas distintivas, tales como su espectro de absorción con un máximo de absorción a 414nm, pero con una funcionalidad clara en la lignificación, como se deduce de su capacidad de oxidar tanto el alcohol coniferílico como el alcohol sinapílico.

vii) Se purificaron y caracterizaron tanto peroxidasas ácidas como básicas del proteoma extracelular de *C. revoluta*. Todas estas proteínas resultaron ser peroxidasas de alto espín capaces de oxidar los alcoholes cinamílicos. Esta propiedad les asigna un papel en la lignificación de las paredes celulares, especialmente a las peroxidasas básicas, que muestran mayor afinidad que las peroxidasas ácidas por el alcohol sinapílico.







## *Bibliografía*



- Abeles FB y Biles CL.** 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol* 95: 269-273.
- Adler A.** 1977. Lignin chemistry past, present and future. *Wood Sci Technol* 11: 169-218.
- Alba CM, de Forchetti SM y Tigier HA.** 1996. Peroxidase and phenoloxidase activities in peach endocarp. En "Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology"(Obinger C, Burner U, Ebermann R, Pennel C, Greppin H, eds) pp 243-246, University of Geneva, Geneva.
- Amthor JS.** 2003. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Ann Bot* 91: 673-695.
- Anterola A y Lewis NG.** 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221-294.
- Anterola AM, Jeon JH, Davin LB y Lewis NG.** 2002. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. *J Biol Chem* 277: 18272-18280.
- Aoyama W, Matsumura A, Tsutsumi Y y Nishida T.** 2001. Lignification and peroxidase in tension wood of *Eucalyptus viminalis* seedlings. *J Wood Sci* 47: 419-424.
- Aoyama W, Sasaki S, Matsumura S, Mitsunaga T, Hirai H, Tsutsumi Y y Nishida T.** 2002. Sinapyl alcohol-specific peroxidase isoenzyme catalyses the formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol. *J Wood Sci*: 497-504.
- Arezki O, Boxus P, Kevers C y Gaspar T.** 2001. Changes in peroxidase activity, and level of phenolic compounds during light-induced plantlet regeneration from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. nodes *in vitro*. *Plant Growth Regul* 33: 215-219.
- Baier M, Goldberg R, Catesson AM, Francesch C y Rolando C.** 1993. Seasonal changes of isoperoxidases from poplar bark tissues. *Phytochemistry* 32: 789-793.
- Bakalovic N, Passardi F, Ioannidis V, Cosio C, Penel C, Falquet L y Dunand C.** 2006. PeroxiBase: a class III plant peroxidase database. *Phytochemistry* 67: 534-539.
- Bakardjieva NT, Christova N y Christov K.** 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitive of peroxidase from mosses (*Mnium sp.*) and ferns (*Polypodium vulgare*) to high temperature. *Can J Bot* 74: 1665-1670.
- Banci L.** 1997. Structural properties of peroxidase. *J Biotechnol* 53: 253-263.
- Bao W, O'Maley DM, Whetten R y Sederoff RR.** 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260: 672-674.
- Barratt DHP, Domoney C y Wang TL.** 1989. Purification and partial characterization of two abscisic-acid-responsive proteins induced in cultured embryos of *Pisum sativum* L. *Planta* 180: 16-23.
- Bartonek-Roxa E, Eriksson H y Mattiasson B.** 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1088: 245-250.
- Battistuzzi G, D'Onofrio M, Loschi L y Sola M.** 2001. Isolation and characterization of two peroxidases from *Cucumis sativus*. *Arch Biochem Biophys* 388: 100-112.
- Bellani LM, Guarnieri M y Scialabba A.** 2002. Differences in the activity and distribution of peroxidases from three different portions of germinating *Brassica oleracea* seeds. *Physiol Plant* 114: 102-108.

- Bell-Lelong DA, Cusumano JC, Meyer K y Chapple C.** 1997. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*: regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol* 113: 729-738.
- Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G y Brunak S.** 2004. Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17: 349-356.
- Berna A y Bernier F.** 1999. Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme. *Plant Mol Biol* 39: 539-549.
- Bernal MA, Bisbis B, Pedreño MA, Kevers C, Penel C y Gaspar T.** 1997. Peroxidase isoenzymes in normal and habituated calli of sugar beet during transfer from light to darkness. *Biol Plant* 39: 161-168.
- Bernal MA, Pedreño MA, Calderón AA, Muñoz R, Ros Barceló A y Merino de Cáceres F.** 1993. The subcellular localization of isoperoxidases in *Capsicum annuum* leaves and their different expression in vegetative and flowered plants. *Ann Bot* 72: 415-421.
- Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A y Plourde GL.** 1999. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol* 121: 135-145.
- Bernier F y Berna A.** 2001. Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiol Biochem* 39: 545-554.
- Biemelt S, Tschiersch H y Sonnewald U.** 2004. Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol* 135: 254-265.
- Billa E, Tollier MT y Monties B.** 1996. Characterization of the monomeric composition of *in situ* wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: effect of temperature and reaction time. *J Sci Food Agric* 72: 250-256.
- 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.
- Blee KA, Jupe SC, Richard G, Zimmerlin A, Davies DR y Bolwell P.** 2001b. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol Biol* 47: 607-620.
- Blee KA, Wheatley ER, Bonham VA, Mitchell GP, Robertson D, Slabas AR, Burrell MM, Wojtaszek P y Bolwell GP.** 2001a. Proteomics analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. *Planta* 212: 404-415.
- Borderies G, Jamet E, Lafitte C, Rossignol M, Januneau A, Boudart G, Monsarrat B, Esquerré-Tugayé MT, Boudet A y Pont-Lezica R.** 2003. Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* 24: 3421-3432.
- Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA y Lamb C.** 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12: 2383-2394.

- Botella MA, Quesada MA, Hasegawa PM y Valpuesta V.** 1993. Nucleotide sequences of two peroxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol* 103: 665-666.
- Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerré-Tugayé MT y Pont-Lezica R.** 2005. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5: 212-221.
- Boudet AM, Lapierre C y Grima-Pettenati J.** 1995. Biochemistry and molecular biology of the lignification. *New Phytol* 129: 203-236.
- Boudet AM.** 1998. A new view of lignification. *Trends Plant Sci* 3: 67-71.
- Boveris AD, Galleano M y Puntarulo S.** 2007. *In vivo* supplementation with *Ginkgo biloba* protects membranes against lipid peroxidation. *Phytother Res* 21: 735-740.
- Boyum R y Guidotti G.** 1997. Glucose-dependent, cAMP-mediated ATP efflux from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143: 1901-1908 .
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248-254.
- Brady JD , Sadler IH y Fry SC.** 1996. Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link. *J Biochem* 315: 323-327.
- Brattain MG, Marks ME y Pretlow TG.** 1976. The purification of horseradish peroxidase by affinity chromatography on Sepharose-bound Concanavalin A. *Anal Biochem* 72: 346-352.
- Brenner ED, Stevenson DW y Twigg RW.** 2003. Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. *Trends Plant Sci* 8: 446-452.
- Brodrick TJ, Holbrook NM y Hill RS.** 2005. Seedling growth in conifers and angiosperms: impacts of contrasting xylem structure. *Aust J Bot* 53: 749-755.
- Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R y Turner SR.** 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17: 2281-2295.
- Brownleader MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin MF y Dey PM.** 1995. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiol* 109: 1115-1123.
- Bruce RJ y West CA.** 1989. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol* 91: 889-897.
- Brunow G, Ede RM, Simola IK y Lemmetyinen J.** 1990. Lignins released from *Picea abies* suspension cultures. True native spruce lignins. *Phytochemistry* 29: 2535-2538.
- Brunow G, Kilpeläinen I, Lapierre C, Lundquist K, Simola LK y Lemmetyinen J.** 1993. The chemical structure of extracellular lignin released from *Picea abies*. *Phytochemistry* 32: 845-850.
- Buchanan BB, Gruissem W y Jones RL.** 2000. Biochemistry & Molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Monona Drive, Rockville USA.
- Cabrera y Poch HL, Peto CA y Chory J.** 1993. A mutation in the *Arabidopsis* DET3 gene uncouples photoregulated leaf development from gene expression and chloroplast biogenesis. *Plant J* 4: 671-682.
- Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R y Ros Barceló A.** 1993. Localization of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. *Hort Sci* 28: 38-40.

- Cano-Delgado AI, Metzlauff K y Bevan MW.** 2000. The eli1 mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Develop* 127: 3395-3405.
- Capellades M, Torres MA, Bastisch I, Stiefel V, Vignols F, Bruce WB, Peterson D, Puigdoménech P y Rigau J.** 1996. The maize caffeic acid O-methyltransferase gene promoter is active in transgenic tobacco and maize plant tissues. *Plant Mol Biol* 31: 307-322.
- Carnachan SM y Harris PJ.** 2000. Ferulic acid is bound to the primary cell walls of all gymnosperm families. *Biochem Syst Ecol* 28: 865-879.
- Carpin S, Crèvecoeur M, de Meyer M, Simon P, Greppin H y Penel C.** 2001. Identification of a Ca<sup>2+</sup>-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *Plant Cell* 13: 511-520.
- Carpin S, Crèvecoeur M, Greppin H y Penel C.** 1999. Molecular cloning and tissue-specific expression of an anionic peroxidase in Zucchini. *Plant Physiol* 120: 799-810.
- Carpita NC y Gibeaut DM.** 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3: 1-30.
- Carpita NC.** 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476.
- Casella L, Gullotti M, Pintar A y Marchesini A.** 1986. Purification and spectral characterization of a paraperoxidase from *Cucurbita pepo* ripe fruits. *Biochim Biophys Acta* 872: 216-225.
- Cassab GI y Varner JE.** 1988. Cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol* 39: 321-353.
- Chabanet A, Goldberg R, Catesson AM, Quinet-Szély M, Delaunay AM y Faye L.** 1994. Characterization and localization of a phenoloxidase in mung bean hypocotyl cell walls. *Plant Physiol* 106: 1095-1102.
- Chabannes M, Ruel K, Chabbert B, Jauneau A, Joseleau JP y Boudet AM.** 2001. In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J* 28: 271-282.
- Chapple CCS, Vogt T, Ellis BE y Somerville CR.** 1992. An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4: 1413-1424.
- Charmont S, Jamet E, Pont-Lezica R y Canut H.** 2005. Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry* 66: 453-461.
- Chavez C y Flurkey WH.** 1984. Biospecific adsorption of peroxidase. *J Chromatogr* 298: 169-171.
- Chen ZD, Manchester SR y Sun HY.** 1999. Phylogeny and evolution of the Betulaceae as inferred from DNA sequences, morphology and paleobotany. *Am J Bot* 86: 1168-1181.
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T y Luan S.** 2002. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 661-677.
- Chibbar RN y van Huystee RB.** 1983. Glutamic acid is the heme precursor for peroxidase synthesized by peanut cells in suspension culture. *Phytochemistry* 22: 1721-1723.
- Chibbar RN, Cella R y van Huystee RB.** 1984. The heme moiety in peroxidase. *Can J Biochem Cell Biol* 62: 1046-1050.



- Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Robertson D, Yu X-L, Knox JP, Bolwell P y Slabas AR.** 2002. Proteomics analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis* 23: 1754-1765.
- Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Montagu MV y Boerjan W.** 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol* 118: 125-135.
- Christensen JH, Overney S, Rohde A, Diaz WA, Bauw G, Simon P, Van Montagu M y Boerjan W.** 2001. The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant Mol Biol* 47: 581-593.
- Christiernin M, Ohlsson AB, Berglund T y Henriksson G.** 2005. Lignin isolated from primary walls of hybrid aspen cell cultures indicates significant differences in lignin structure between primary and secondary cell wall. *Plant Physiol Biochem* 43: 777-785.
- Cleves AE.** 1997. Protein transport: the nonclassical ins and outs. *Curr Biol* 7: 318-320.
- Collen J, Ekdhal A, Abrahamsson K y Pedersen M.** 1994. The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. *Phytochemistry* 36: 1197-1202.
- Collin HA y Edwards S.** 1998. En *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, pp 1-43.
- Collinge M y Boller T.** 2001. Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol* 46: 521-529.
- Converso DA y Fernández ME.** 1996. Ca<sup>2+</sup> activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control. *Arch Biochem Biophys* 333: 59-65.
- Cooper JB, Heuser JE y Varner JE.** 1994. 3,4-Dehydroproline inhibits cell wall assembly and cell division in tobacco protoplasts. *Plant Physiol* 104: 747-754.
- Cosgrove DJ.** 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 171-201.
- Cosgrove DJ.** 2000. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol Biochem* 38: 109-124.
- Cosgrove DJ.** 2001. Wall structure and wall loosening. A look backwards and peanut forwards. *Plant Physiol* 125: 131-134.
- Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H y Penel C.** 1997. Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochem* 99: 177-186.
- Crofts AJ, Leborgne-Castel N, Hillmer S, Robinson DG, Phillipson B, Carlsson LE, Ashford DA y Denecke J.** 1999. Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde Bulk Flow. *Plant Cell* 11: 2233-2247 .
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C y Piñol MT.** 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspensión cultures of *Taxus media*. *Biotechnol Prog* 18: 418-423.
- Czaninski Y y Catesson AM.** 1969. Localisation ultrastructurale d'activites peroxydasiques dans les tissus conducteurs vegetaux au cours du cycle annuel. *J Microscopie* 8: 875-888.
- Davin LB y Lewis NG.** 2000. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol* 123: 453-461.

- Davin LB, Bedgar DL, Katayama T y Lewis NG.** 1992. On the stereoselective synthesis of ( $\pi$ )-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 31: 3869-3874.
- de Jong A, Cordewener J, LoSchiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A y de Vries S.** 1992. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4: 425-433.
- de Marco A, Guzzardi P y Jamet E.** 1999. Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol* 120: 371-381.
- de Souza IRP y MacAdam JW.** 1998. A transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes in elongation rate of B73 maize (*Zea mays*) leaf blades. *Physiol Plant* 104: 556-562.
- Dean JFD y Eriksson KEL.** 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48: 21-33.
- Dean JFD, Sterjiades R y Eriksson KEL.** 1994. Purification and characterization of an anionic peroxidase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures. *Physiol. Plant* 92: 233-240.
- Degl'Innocenti E, Guidi L, Pardossi A y Tognoni F.** 2005. Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *acephala*). *J Agric Food Chem* 53: 9980-9984.
- Deighton N, Richardson A, Stewart D y McDougall GJ.** 1999. Cell-wall associated oxidases from the lignifying xylem of angiosperms and gymnosperms: monolignol oxidation. *Holzforschung* 53: 503-510.
- Del Río JC, Marques G, Rencoret J, Martínez AT y Gutiérrez A.** 2007. Occurrence of naturally acetylated lignin units. *J Agric Food Chem* 55: 5461-5468.
- Demura T, Tashiro G, Horiguchi G, Kishimoto N, Kubo M, Matsuoka N, Minami A, Nagata-Hiwatashi M, Nakamura K, Okamura Y, Sassa N, Suzuki S, Yazaki J, Kikuchi S y Fukuda H.** 2002. Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15794-15799.
- Devan M, Shufflebottom D, Edwards K, Jefferson R y Schuch W.** 1989. Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *EMBO J* 8: 1899-1906.
- Dharmawardhana DP, Ellis BE y Carlson JE.** 1995. A  $\beta$ -glucosidase from logdepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol* 107: 331-339.
- Dixon RA, Chen F, Guo D y Parvathi K.** 2001. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* 57: 1069-1084.
- Domon JM, Neutelings G, Roger D, David A y David H.** 2000. A basic chitinase-like protein secreted by *Pinus caribaea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. *J Plant Physiol* 156: 33-39.
- Donaldson LA.** 1985. Critical assessment of interference microscopy as a technique for measuring lignin distribution in cell walls. *NZJ For Sci* 15: 349-360.

- Donaldson LA.** 1994. Mechanical constraints on lignin deposition during lignification. *Wood Sci Technol* 28: 111-118.
- Donaldson LA.** 2001. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57: 859-873.
- Douglas CJ, Hauffe KD, Ites-Morales ME, Ellard M, Paszkowski U, Hahlbrock K y Dangl JL.** 1991. Exonic sequences are required for elicitor and light activation of a plant defense gene, but promoter sequences are sufficient for tissue specific expression. *EMBO J* 10: 1767-1775.
- Douglas CJ.** 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci* 1: 171-178.
- Dowd PW y Norton RA.** 1995. Browning-associated mechanism of resistance to insects in corn callus tissues. *J Chem Ecol* 21: 583-600.
- Driouich A, Laine AC, Vian B y Faye L.** 1992. Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore. *Plant J* 2: 13-24.
- 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.
- Dumas B, Freyssinet G y Pallett K.** 1995. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. *Plant Physiol* 107: 1091-1096.
- Dunwell JM, Khuri S y Gane PJ.** 2000. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during the evolution of the cupin superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 153-179.
- Dunwell JM.** 1998. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol Gen Eng Rev* 15: 1-32.
- Durbeej B y Eriksson LA.** 2003. Formation of  $\beta$ -O-4 lignin models – a theoretical study. *Holzforschung* 57: 466-478.
- Duroux L y Welinder KG.** 2003. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J Mol Evol* 57: 397-407.
- Eberhardt TL, Bernardst MA, He L, Davin LB, Wooten JB y Lewis NG.** 1993. Lignification in cell suspension cultures of *Pinus taeda*. In situ characterization of a gymnosperm lignin. *J. Biol. Chem.* 268: 21088-21096.
- Edwards SR, Braley R y Chaffin WL.** 1999. Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 177: 211-216.
- Egea C, Ahmed AS, Candela M y Candela ME.** 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *J Plant Physiol* 158: 151-158.
- Eisenhaber F y Bork P.** 1998. Wanted: subcellular localization of proteins based on sequence. *Trends Cell Biol* 8: 169-170.
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O y Moritz T.** 2000. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat Biotechnol* 18: 784-788.
- Esau K.** 1977. *Anatomy of seed plants*, ed 2<sup>nd</sup>. San Francisco: John Wiley & Sons.

- Escribano J, Gandía-Herrero F, Caballero N y Pedreño MA.** 2002. Subcellular localization and isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 50: 6123-6129.
- Falco MC, Januzzi Mendes BM y Tulmann Neto A.** 1996. Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration. *R Bras Fisiol Veg* 8: 1-6.
- Ferrer MA y Ros Barceló A.** 1994a. Genistein as an endogenous natural substrate of acidic peroxidases in lupin hypocotyls. *Ann Appl Biol* 125: 173-178.
- Ferrer MA y Ros Barceló A.** 1994b. Control of the lignification in *Lupinus* by genistein acting as superoxide scavenger and inhibitor of the peroxidase-catalyzed oxidation of coniferyl alcohol. *J Plant Physiol* 144: 64-67.
- Ferrer MA, Pedreño MA, Muñoz R y Ros Barceló A.** 1990. Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O<sub>2</sub>. A model for the lignification of plant cell walls in the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *FEBS Lett* 276: 127-130.
- Ferrer MA, Pedreño MA, Ros Barceló A y Muñoz R.** 1992. The cell wall localization of two strongly basic isoperoxidases in etiolated *Lupinus albus* hypocotyls and its significance in coniferyl alcohol oxidation and indole-3-acetic acid catabolism. *J Plant Physiol* 139: 611-616.
- Flurkey WH, Young LW y Jen JJ.** 1978. Separation of soybean lipoxygenase and peroxidase activities by hydrophobic chromatography. *J Agric Food Chem* 26: 1474-1476.
- Fossdal CG, Sharma P y Lonneborg A.** 2001. Isolation of the first putative peroxidase cDNA from a conifer and the local and systemic accumulation of related proteins upon pathogen infection. *Plant Mol Biol* 47: 423-435.
- Foucart C, Paux E, Ladouce N, San-Clemente H, Grima-Pettenati J y Sivadon P.** 2006. Transcript profiling of a xylem vs phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xylogenesis in *Eucalyptus*. *New Phytol* 170: 739-752.
- 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 Journal* 30: 47-59.
- Franke R, McMichael CM, Meyer K, Shirley AM, Cusumano JC y Chapple C.** 2000. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J* 22: 223-234.
- Franz P, de Ruitger NCA y Schel JHN.** 1989. Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus culture of maize (*Zea mays* L.) *Plant Cell Rep* 8: 67-70.
- Freudenberg K, Hen CL, Harkin JM, Nimz H y Renner H.** 1965. Observations on lignin. *Chem Commun*: 224-225.
- Fry SC.** 1988. *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*. John Wiley & Sons, New York.
- Fry SC.** 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 497-520.
- Fry SC.** 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem J* 332: 507-515.

- Fujiyama K, Takemura H, Shinmyo A, Okada H y Takano M.** 1990. Genomic DNA structure of two new horseradish-peroxidase-encoding genes. *Gene* 89: 163-169.
- Fukuda H y Komamine A.** 1980. Establishment of an experimental system for the tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol* 65: 57-60.
- Fukuda H y Komamine A.** 1982. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Planta* 155: 423-430.
- Fukuda H.** 1992. Tracheary element formation as a model of cell differentiation. *Int Rev Cytol* 136: 289-332.
- Fukuda H.** 1996. Xylogenesis: Initiation, progression and cell death. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 299-325.
- Fukuda T, Mott RL y Harada C.** 1988. Studies of tissue culture of tree cambium XI. Characterization of lignin in suspension-cultured cells of loblolly pine. *Mokuzai Gakkaishi* 34: 149-154.
- Fukushima K y Terashima N.** 1991. Heterogeneity in formation of lignin XIV. Formation and structure of lignin in differentiation xylem of *Ginkgo biloba*. *Holzforschung* 45: 87-94.
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2005. Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol* 139: 1138-1154.
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Merino F, Cuello J, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2006. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. *FEBS Lett.* 580:4311-4316.
- Gamborg OL, Miller RA y Ojima K.** 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
- Gavnholt B, Larsen K y Rasmussen SK.** 2002. Isolation and characterisation of laccase cDNA's from meristematic and stem tissues of ryegrass (*Lolium perenne*). *Plant Sci* 162: 873-885.
- Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, Mihaljevic S, Rech P, Jauneau A, Lapierre C, Pollet B, Verhaegen D, Chaubet-Gigot N y Grima-Pettenati J.** 2005. *EgMYB2*, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J* 43: 553- 567.
- Goldberg R, Liberman M, Mathieu C, Pierron M y Catesson AM.** 1987. Development of epidermal cell wall peroxidases along the mung bean hypocotyl: possible involvement in the cell wall stiffening process. *J Exp Bot* 38: 1378-1390.
- Gómez Ros LV, Aznar-Asensio G, Hernández JA, Bernal MA, Núñez-Flores MJL, Cuello J y Ros Barceló A.** 2007a. Structural motifs of syringyl peroxidases are conserved during angiosperm evolution. *J Agric Food Chem* 55:4131-4138
- Gómez Ros LV, Espiñeira JM, Pomar F, Merino F, Cuello J y Ros Barceló A.** 2007b. The monomer composition controls the  $\Sigma\beta\text{-O-4}/\Sigma\text{O-4}$  end monomer ratio of the linear lignin fraction. *J Wood Sci* 53: 314-319.

- Gómez-Ros LV, Gabaldón C, Pomar F, Merino F, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2007c. Structural motifs of syringyl peroxidases pre-date not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. *New Phytol* 173: 63-78.
- Gómez-Ros LV, Paradiso A, Gabaldón C, Pedreño MA, de Gara L y Ros Barceló A.** 2006. Two distinct cell sources of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the lignifying *Zinnia elegans* cell culture system. *Protoplasma* 227: 175-183.
- Gómez-Vásquez R, Day R, Buschmann H, Randles S, Beeching JR y Cooper RM.** 2004. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Ann Bot* 94: 87-97.
- Grabber JH, Hatfield RD y Ralph J.** 2003. Apoplastic pH and monolignol addition rate effects on lignin formation and cell wall degradability in maize. *J Agric Food Chem* 51: 4984-4989.
- Grabber JH, Ralph J y Hatfield RD.** 1998. Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferylaldehyde. *J Sci Food Agric* 78: 81-87.
- Graham LS y Sticklen MB.** 1994. Plant chitinases. *Can J Bot* 72: 1057-1083.
- Grambow HJ y Langenbeck-Schwich B.** 1983. The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxidase, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. *Planta* 157: 131-137.
- Gray JSS, 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.
- Grisebach H.** 1981. Lignins. En "The Biochemistry of plants. A comprehensive treatise" (Conn EE, ed) Academic Press
- Gross GG, Janse C y Elstner EF.** 1977. Involvement of malate, monophenols, and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 136: 271-276.
- Gross GG.** 1980. The biochemistry of lignification. *Adv Bot Res* 8: 25-63.
- Grotewold E, Drummond BJ, Bowen B y Peterson T.** 1994. The myb-homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* 76: 543-553.
- Guillaumie S, San-Clemente H, Deswarte C, Martinez Y, Lapierre C, Murigneux A, Barrière Y, Pichon M y Goffner D.** 2007. Maizewall. Database and developmental gene expression profiling of cell wall biosynthesis and assembly in maize. *Plant Physiol* 143: 339-363.
- Gutiérrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, Del Río JC y Martínez AT.** 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environ Sci Technol* 41: 4124-4129.
- Hagihara B, Tagawa K, Morikawa I, Shin M y Okunuki K.** 1958. Two crystalline haemoproteins of wheat. *Nature* 181: 1656-1658.
- Hahlbrock K y Scheel D.** 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 347-369.

- Hano C, Addi M, Bensaddek L, Crônier D, Baltora-Rosset S, Doussot J, Maury S, Mesnard F, Chabbert B, Hawkins S, Lainé E y Lamblin F.** 2005. Differential accumulation of monoglignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta* 223: 975-989.
- Hapiot P, Pinson J, Neta P, Francesch C, Mhamdi F, Rolando C y Schneider S.** 1994. Mechanism of oxidative coupling of coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 36: 1013-1020.
- Harkin JM y Obst JR.** 1973. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180: 296-298.
- Hatfield RD y Vermerris W.** 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol* 126: 1351-1357.
- Hatfield RD, Grabber J, Ralph J y Brei K.** 1999. Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: some cautionary notes. *J Agric Food Chem* 47: 628-632.
- Hauffe KD, Paszkowski U, Schulze-Lefert P, Hahlbrock K, Dangl JL y Douglas CJ.** 1991. A parsley 4CL-1 promoter fragment specifies complex expression patterns in transgenic tobacco. *Plant Cell* 3: 435-443.
- Hazlewood GP y Gilbert HJ.** 1998. Structure and function analysis of *Pseudomonas* plant cell wall hydrolases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 211-241.
- Held MA, Tan L, Kamyab A, Hare M, Shpak E y Kieliszewski MJ.** 2004. Di-isodityrosine is the intermolecular crosslink of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked in vitro. *J Biol Chem* 279: 55474-55482.
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM y Fischer R.** 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotech* 11: 1415-1422.
- Hendriks T y van Loon LC.** 1990. Petunia peroxidase a is localized in the epidermis of aerial plant organs. *J Plant Physiol* 136: 519-525.
- Henriksen A, Smith AT y Gajhede M.** 1999. The structure 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.
- Heredia A, Jimenez A y Guillen R.** 1995. Composition of plant cell walls. *Z Lebensm Unters Forsch* 200: 24-31.
- Herrmann KM.** 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlén M, Teeri TT, Lundeberg J, Sundberg B, Nilsson P y Sandberg G.** 2001. A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14732-14737.
- Higuchi T, Ito T, Umezawa T, Hibino T y Shibata D.** 1994. Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene: wine-red lignin from coniferyl aldehyde. *J Biotech* 37: 151-158.
- Higuchi T.** 1980. *En Lignin Biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications* (Kirk TD y Chang HM eds) Vol 1 pp 1-19, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Higuchi T.** 1985. Biosynthesis of lignin. En "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components" (Higuchi T, ed) pp 141-160, New York, Academic Press.

- 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, Sasaki K, Yamakawa H, Mitsuhashi I, Toshima H, Matsui H, Homma M y Ohashi Y.** 2000a. Wound-induced expression of a tobacco peroxidase is not enhanced by ethephon and suppressed by methyl jasmonate and coronatine. *Plant Cell Physiol* 41: 165-170.
- Hiraga S, Yamamoto K, Ito H, Sasaki K, Matsui H, Honma M, Nagamura Y, Sasaki T y Ohashi Y.** 2000b. Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase gene. *FEBS Letters* 471: 245-250.
- Hirano H, Komatsu S, Kajiwara H, Takagi H y Tsunasawa S.** 1993. Microsequence analysis of the N-terminally blocked proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membrane by Western blotting. *Electrophoresis* 14: 839-846.
- Holm KB, Andreassen PH, Eckloff MG, Kristensen BK y Rasmussen SK.** 2003. Three differentially expressed basic peroxidases from wound-lignifying *Asparagus officinalis*. *J Exp Bot* 54: 2275-2284.
- Honée G, Buitink J, Jabs T, de Kloe J, Sijbolts F, Apotheker M, Weide R, Sijen T, Stuiver M y de Wit PJGM.** 1998. Induction of defense – related responses in Cf9 tomato cells by the AVR9 elicitor peptide of *Cladosporium fulvum* is developmentally regulated. *Plant Physiol* 117: 809-820.
- Hosokawa M, Suzuki S, Umezawa T, Hibino T y Sato Y.** 2001. Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 42: 959-968.
- Hoson T, Wakabayashi K y Masuda Y.** 1995. Inhibition of the break-down of xyloglucans in azuki bean epicotyls by Concanavalin A. *Plant Cell Physiol* 36: 897-902.
- Hoyle MC.** 1977. High resolution of peroxidase-indolacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol* 60: 787-793.
- Huh GH, Lee SJ, Bae YS, Liu JR y Kwak SS.** 1997. Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspension cultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. *Mol Gen Genet* 255: 382-391.
- Hurkman WJ y Tanaka CK.** 1996. Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection. *Plant Physiol* 111: 735-739.
- Iiyama K y Wallis AF.** 1988. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Sci Technol* 22: 271-280.
- Iiyama K, Lam TB, Meikle PJ, Ng K, Rhodes DI y Stone BA.** 1993. Cell wall biosynthesis and its regulation. En: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J (eds) *Forage cell wall structure and digestibility*. Am Soc Agronomy, Madison, pp 621-683.
- Ikegawa T, Mayama S, Nakayashiki H y Kato H.** 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. *Physiol Mol Plant Pathol* 48: 245-255.



- Imin N, De Jong F, Mathesius U, van Noorden G, Saeed N, Wang X, Rose R y Rolfe B.** 2004. Proteome references maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics* 4: 1883-1896.
- Imoto K, Yokoyama R y Nishitani K.** 2005. Comprehensive approach to genes involved in cell wall modifications in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 58: 177-192.
- Iori R, Cavalieri B y Palmieri S.** 1995. Cathodic peroxidases of durum wheat flour. *Cereal Chem* 72: 176-181.
- Ito H, Tsugawa H, Matsui H, Honma M, Otsuki Y, Murakami T y Ohashi Y.** 2000. Xylem-specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plants. *Plant Sci* 155: 85-100.
- IUCN.** 2007. IUCN Red list of threatened species ([www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)).
- Jackson PAP, Galinha CIR, Pereira CS, Fortunato A, Soares NC, Amâncio SBQ y Pinto Ricardo CP.** 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.
- Jacquet G, Pollet B, Lapierre C, Mhamdi F y Rolando C.** 1995. New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *J Agr Food Chem* 43: 2746-2751.
- Jamet E, Canut H, Boudart G y Pont-Lezica RF.** 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci* 11: 33-39.
- Jen JJ, Seo A y Flurkey WH.** 1980. Tomato peroxidase: purification via hydrophobic chromatography. *J Food Sci* 45: 60-63.
- Jespersen HM, Kjaersgard IV, Østergaard L y Welinder KG.** 1997. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem J* 326: 305-310.
- Jin H, Cominelli E, Bailey P, Parr A, Mehrtens F, Jones J, Tonelli C, Weisshaar B y Martin C.** 2000. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J* 19: 6150-6161.
- Johnson DB, Moore WE y Zank LC.** 1961. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *Tappi* 44: 793-789.
- Jones L, Ennos AR y Turner SR.** 2001. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 26: 205-216.
- Kärkönen A, Koutaniemi S, Mustonen M, Syrjänen K, Brunow G, Kilpeläinen I, Teeri TH y Simola LK.** 2002. Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. *Physiol Plant* 114: 343-353.
- Kawaoka A, Kaothien P, Yoshida K, Endo S, Yamada K y Ebinuma H.** 2000. Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J* 26: 289-301.
- Keller B.** 1994. Gene expression of plant extracellular proteins. En "Genetic Engineering" (Setlow JK ed) 16:255-270, New York, Plenum Press.
- Khuri S, Bakker FT y Dunwell JM.** 2001. Phylogeny, function and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Mol Biol Evol* 18: 593-605.
- Kim DS, Kim JY y Han YS.** 2007a. Alzheimer's disease drug discovery from herbs: neuroprotectivity from beta-amyloid (1-42) insult. *J Altern Complement Med* 13: 333-40.

- Kim H, Ralph J, Lu L, Pilate P, Leplé JC, Pollet B y Lapierre CB.** 2002. Identification of the structure and origin of thioacidolysis marker compounds for cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in angiosperms. *J Biol Chem* 49: 47412-47419.
- Kim HJ, Pesacreta TC y Triplett BA.** 2004. Cotton-fiber germin-like protein. II: Immunolocalization, purification, and functional analysis. *Planta* 218: 525-535.
- Kim JK, Bamba T, Harada K, Fukusaki E y Kobayashi A.** 2007b. Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *J Exp Bot* 58: 415-424.
- Kjæråsård IVH, Jespersen HM, Rasmussen SK y Welinder KG.** 1997. Sequence and RT-PCR expression analysis of two peroxidases from *Arabidopsis thaliana* belonging to a novel evolutionary branch of plant peroxidases. *Plan Mol Biol* 33: 699-708.
- Ko JH, Han KH, Park S y Yang J.** 2004. Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiol* 135: 1069-1083.
- Kobayashi T, Taguchi H, Shigematsu M y Tanahashi M.** 2005. Substituent effects of 3,5-disubstituted *p*-coumaryl alcohols on their oxidation using horseradish peroxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the oxidant. *J Wood Sci* 51: 607-614.
- Koutaniemi S, Warinowski T, Kärkönen A, Alatalo E, Fossdal CG, Saranpää P, Laadso T, Fagerstedt KV, Simola LK, Paulin L, Rudd S y Teeri TH.** 2007. Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Mol Biol* 65: 311-328.
- Kozela C y Regan S.** 2003. How plants make tubes. *Trends Plant Sci* 8: 159-164.
- Kretschmann D.** 2003. The remarkable deformability of wood in a moist environment resembles that of ductile metals. A combination of traditional mechanical tests and cutting-edge diffraction experiments reveal the molecular mechanism that determines such behaviour. *Nat Mat* 2: 775-776.
- Kristensen BK, Bloch H y Rasmussen SK.** 1999. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. *Plant Physiol* 120: 501-512.
- Krsnik-Rasol M.** 1991. Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. *Int J Devel Biol* 35: 259-263.
- Krylov SN, Krylova SM y Rubin LB.** 1993. Threshold effect of caffeic acid on peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 33: 9-12.
- Kumar S, Dutta A, Sinha AK y Sen J.** 2007. Cloning, characterization and localization of a novel basic peroxidase gene from *Catharantus roseus*. *FEBS J* 274: 1290-1303.
- Kwon HK, Yokoyama R y Nishitani K.** 2005. A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of *Arabidopsis* suspension-cultured cells. *Plant Cell Physiol* 46: 843-857.
- Lacombe E, Van Doorselaere J, Boerjan W, Boudet AM y Grima-Pettenati J.** 2000. Characterization of *cis*-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. *Plant J* 23: 663-676.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- LaFayette PR, Eriksson KE y Dean JFD.** 1999. Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). *Plant Mol Biol* 40: 23-35.
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M y Rothstein S.** 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7542-7546.
- Lagrimini LM, Gingas V, Finger F, Rothstein S y Liu TY.** 1997. Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiol*: 114: 1187-1196.
- Lagrimini LM.** 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol* 96: 577-583.
- Lai YZ y Sarkanen KV.** 1975. Structural variation in dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol. *Cellulose Chem Tech* 9: 239-245.
- Lane B.** 1994. Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB J* 8: 294-301.
- Lane BG.** 2000. Oxalate oxidase and differentiating surface structure in wheat: germins. *Biochem J* 49: 309-321.
- Lange BM, Lapierre C y Sandermann H.** 1995. Elicitor-induced spruce stress lignin. *Plant Physiol* 108: 1277-1287.
- Lapierre CB, Pollet B y Rolando C.** 1995. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Res Chem Intermed* 21: 397-412.
- Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori W y Hohtola A.** 2000. Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiol* 20: 467-475.
- Lauvergeat V, Rech P, Jauneau A, Guez C, Coutos-Thevenot P y Grima-Pettenati J.** 2002. The vascular expression pattern directed by the *Eucalyptus gunnii* cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. *Plant Mol Biol* 50: 497-509.
- Lawton KA, Beck J, Potter S, Ward E y Ryals J.** 1994. Regulation of cucumber Class III chitinase gene expression. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 48-57.
- Lee CY y Whitaker JR.** 1995. Enzymatic browning and its prevention. American Chemical Society, Washington.
- Lee H, Lee JS, Noh EW, Bae EK, Choi YI y Han MS.** 2005. Generation and analysis of expressed sequence tags from poplar (*Populus alba* x *P. tremula* var. *glandulosa*) suspension cels. *Plant Sci* 169: 1118-1124.
- Lee SJ, Saravanan RS, Damasceno CMB, Yamane H, Kim B-D y Rose JKC.** 2004. Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiol Biochem* 42: 979-988.
- Lei Z, Elmer AM, Watson BS, Dixon RA, Mendes PJ y Sumner LW.** 2005. A two-dimensional electrophoresis proteomic reference map and systematic identification of 1367 proteins from a cell suspension culture of the model legume *Medicago truncatula*. *Mol Cel Proteomics* 4: 1812-1825.
- Levy A, Liang X, Pintor-Toro JA, Dixon RA, Lamb CJ.** 1992. *cis*-Element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* 4: 263-271.

- Lewis NG y Davin LB.** 1999. Lignans: biosynthesis and function. In Comprehensive natural products chemistry – polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. Vol 1. (Eds DHR Barton and K Nakanishi) pp 617-745. (Elsevier Science, New York)
- Lewis NG y Yamamoto E.** 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496.
- Lewis NG, Davin LB y Sarkanen S.** 1999. The nature and function of lignins. En: D.H.R. Barton, K. Nakasaki, O. Methcohn (Eds.) *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 3 Pergamon Press pp. 617-745.
- Li L, Popko JL, Umezawa T y Chiang VL.** 2000. 5-hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J Biol Chem* 275: 6537-6545.
- Li Y, Kajita S, Kawai S, Katayama Y y Morohoshi N.** 2003. Downregulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. *J Plant Res* 116: 175–182.
- Li ZC, McClure JW y Hagerman AE.** 1989. Soluble and bound apoplastic activity for peroxidase,  $\beta$ -D-glucosidase, malate dehydrogenase, and nonspecific arylesterase, in barley (*Hordeum vulgare L.*) and oat (*Avena sativa L.*) primary leaves. *Plant Physiol* 90: 185-190 .
- Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL y Yanofsky MF.** 2000. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770.
- Liu L, Dean JFD, Friedman WE y Eriksson KEL.** 1994. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *Plant J* 6: 213-224.
- López Arnaldos M, Ferrer MA, Calderón García AA y Muñoz R.** 2002. Changes in peroxidase activity and isoperoxidase pattern during strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus development. *J Plant Physiol* 159: 429-435.
- López-Molina D, Heering HA, Smulevich G, Tudela J, Thorneley RNF, García-Cánovas F y Rodríguez-López JN.** 2003. Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus L.* *J Inorg Biochem* 94: 243-254.
- López-Serrano M y Ros Barceló A.** 1998. Peroxidase-mediated browning reactions in plant foods. *Recent Res Dev Agric Food Chem* 2: 549-563.
- López-Serrano M, Fernández MD, Pomar F, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2004. *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *J Exp Bot* 55: 423-431.
- Loukili A, Limam F, Ayadi A, Boyer N y Ouelhazi L.** 1999. Purification and characterization of a neutral peroxidase induced by rubbing tomato internodes. *Physiol Plant* 105: 24-31.
- Mader JC y Hanke DE.** 1997. Polyamine sparing may be involved in the prolongation of cell division due to inhibition of phenylpropanoid synthesis in cytokinin-starved soybean cells. *J Plant Growth* 16: 89-93.
- Mäder M.** 1992. Compartmentation of peroxidase isoenzymes in plant cells. En C. Penel, T. Gaspar, H. Greppin, eds, *Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical and Physiological Aspects*. Université de Genève, pp 37-46.

- Maldonado BA y van Huystee RB.** 1980. Isolation of a cationic peroxidase from cultured peanut cells. *Can J Bot* 58: 2280-2284.
- Marjamaa K, Hildén K, Kukkola E, Lehtonen M, Holkeri H, Haapaniemi P, Koutaniemi S, Teeri TH, Fagersdet K y Lundell T.** 2006a. Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in lignifying xylem of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol Biol* 61: 719-732.
- Marjamaa K, Kukkola E, Lundell T, Karhunen P, Saranpää P y Fagerstedt KV.** 2006b. Monolignol oxidation by xylem peroxidase isoforms of Norway spruce (*Picea abies*) and silver birch (*Betula pendula*). *Tree Physiol* 26: 605-611.
- Martin C y Paz-Ares J.** 1997. MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* 13: 67-73.
- Mathesius U.** 2001. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J Exp Bot* 52: 419-426.
- Matlok J, Krzakowa M, y Rudolph H.** 1989. Peroxidase patterns in Bryophytes: a critical evaluation. *J Hattori Bot Lab* 67: 407-414.
- McCartney L, Ormerod AP, Gidley MJ y Know PJ.** 2000. Temporal and spatial regulation of pectin (1→4)-β-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *Plant J* 22: 105-113.
- McDougall GJ y Morrison IM.** 1996. Extraction and partial purification of cell wall-associated coniferyl alcohol oxidase from developing xylem of Sitka spruce. *Holzforschung* 50: 549-553.
- McDougall GJ.** 1992. Changes in the cell wall associated peroxidases during the lignification of flax fibers. *Phytochemistry* 31: 3385-3389.
- McDougall GJ.** 2001. Cell-wall-associated peroxidases from the lignifying xylem of angiosperms and gymnosperms: monolignol oxidation. *Holzforschung* 55: 246-249.
- McEldoon JP y Dordick JS.** 1996. Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol Prog* 12: 555-558.
- McLusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P y Mansfield JW.** 1999. Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarization, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant J* 17: 523-534.
- McMannus MT y Ashford DA.** 1997. Glycosylation of plant peroxidases. *Plant Perox Newslett* 10: 15-23.
- Melo NS, Larsen E, Welinder KG y Fevereiro PS.** 1997. Characterization of two major cationic peroxidases from cell suspension cultures of *Vaccinium myrtillus*. *Plant Sci* 122: 1-10.
- Membré N, Bernier F, Staiger D y Berna A.** 2000. *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta* 211: 345-354.
- Messner B y Boll M.** 1993. Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 34: 261-269.
- Mika A y Lüthje S.** 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol* 132: 1489-1498.

- Milioni D, Sado PE, Stacey NJ, Domingo C, Roberts K y McCann MC.** 2001. Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia* mesophyll cell system. *Plant Mol Biol* 47: 221-238.
- Milioni D, Sado PE, Stacey NJ, Roberts K y McCann MC.** 2002. Early gene expression associated with the commitment and differentiation of a plant tracheary element is revealed by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis. *Plant Cell* 14: 2813-2824.
- Minic Z y Jouanin L.** 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* 44: 435-449.
- Mitchell DI y Cowan AK.** 2003. Mevastatin-induced inhibition of cell growth in avocado suspension cultures and reversal by isoprenoid compounds. *Afr J Biotechnol* 2: 264-270.
- Mo L, Egertsdotter U y Von A.** 1996. Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Ann Bot* 77: 143-152.
- Mohan R, Bajar AM y Kolattukudy PE.** 1993. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (tap 1) by wounding in transgenic tobacco and activation of tap1/GUS and tap2/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. *Plant Mol Biol* 12: 341-354.
- Möller R, Ball RD, Henderson AR, Modzel G y Find J.** 2006. Effect of light and activated charcoal on tracheary element differentiation in callus cultures of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Tiss Org Cult* 85: 161-171.
- Möller R, Koch G, Nanayakkara B y Schmitt U.** 2005. Lignification in cell cultures of *Pinus radiata*: activities of enzymes and lignin topochemistry. *Tree physiology* 26: 201-210.
- Möller R, McDonald AG, Walter C y Harris PJ.** 2003. Cell differentiation, secondary cell-wall formation and transformation of callus tissues of *Pinus radiata* D, Don. *Planta* 217: 736-747.
- Motose H, Fukuda H y Sugiyama M.** 2001. Involvement of local intercellular communication in the differentiation of zinnia mesophyll cells into tracheary elements. *Planta* 213: 121-131.
- Moyano E, Palazón J, Bonfill M, Osuna L, Cusió RM, Oksman-Caldentey KM y Piñol MT.** 2007. Biotransformation of hyoscyamine into scopolamine in transgenic tobacco cell cultures. *J Plant Physiol* 164: 521-524.
- Murashige T y Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 45: 473-497.
- Müsel G, Schindler T, Bergfeld R, Ruel K, Jacquet G, Lapierre C, Speth V y Schopfer P.** 1997. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta* 201: 146-159.
- Narita H, Asaka Y, Ikura K, Matsumoto S y Sasaki R.** 1995. Isolation, characterization and expression of cationic peroxidase isozymes released into the medium of cultured tobacco cells. *Eur J Biochem* 228: 855-862.
- Ndimba BK, Chivasa S, Hamilton JM, Simon WJ y Slabas AR.** 2003. Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of *Arabidopsis* cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics* 3: 1047-1059.
- Neale AD, Wahleithner J, Lund M, Bonnett HT, Kelly A, Meeks-Wagner DR, Peacock WJ y Dennis ES.** 1990. Chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell* 2: 673-684.

- Neish AC.** 1968. Monomeric intermediates in the biosynthesis of lignin. En "Constitution and Biosynthesis of Lignin" (Freudentberg K, Neish AC, eds) pp 3-43, New York, Springer-Verlag.
- Neustaedter DA, Lee SP y Douglas CJ.** 1999. A novel parsley *4CL1* cis-element is required for developmentally regulated expression and protein-DNA complex formation. *Plant J* 18: 77-88.
- Newman LJ, Perazza DE, Juda L y Campbell MM.** 2004. Involvement of the R2R3-MYB, *AtMYB61*, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the *det3* mutant phenotype. *Plant J* 37: 239-250.
- Niklas KJ.** 1997. *The Evolutionary Biology of Plants*. University of Chicago Press.
- Nissum M, Neri F, Mandelman T, Poulos TL y Smulevich G.** 1998. Spectroscopic characterization of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase: similarities and differences with cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* 37: 8080-8087.
- Normanly J, Slovin JP y Cohen JD.** 1995. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol* 107: 323-329.
- Norstog KJ y Nicholls TJ.** 1997. *The biology of the Cycads*. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Northcote DH.** 1995. Aspects of vascular tissue differentiation in plants: parameters that may be used to monitor the process. *Int J Plant Sci* 156: 145-156.
- Nose M, Bernards MA, Furlan M, Zajicek J, Eberhardt TL y Lewis NG.** 1995. Towards the specification of consecutive steps in macro-molecular lignin assembly. *Phytochemistry* 39: 71-79.
- O'Malley DM, Whetten R, Bao W, Chen CL y Sederoff RR.** 1993. The role of laccase in lignification. *Plant J* 4: 751-757.
- Oakley BR, Kirsch DR y Morris NR.** 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105: 361-363.
- Ogawa K, Kanematsu S y Asada K.** 1997. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol* 38: 1118-1126.
- Ohlsson AB, Djerbi S, Winzell A, Bessueille L, Ståldal V, Li X, Blomqvist K, Bulone V, Teeri TT y Berglund T.** 2006. Cell suspension cultures of *Populus tremula* x *P. tremuloides* exhibit a high level of cellulose synthase gene expression that coincides with increased in vitro cellulose synthase activity. *Protoplasma* 228: 221-229.
- Okamoto-Nakazato A, Takahashi K, Kido N, Owaribew K y Katou K.** 2000. Molecular cloning of yieldins regulating the yield threshold of cow-pea cell walls: cDNA cloning and characterization of recombinant yieldin. *Plant Cell Environ* 23: 155-164.
- Osakabe K, Koyama H, Kawai S, Katayama Y y Morohoshi N.** 1994. Molecular cloning and the nucleotide sequences of two novel cDNAs that encode anionic peroxidases of *Populus kitakammiensis*. *Plant Sci* 103: 167-175.
- Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP y Chang VL.** 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8955-8960.

- Østergaard L, Abelskov AK, Mattson O y Welinder KG.** 1996. Structure and organ specificity of an anionic peroxidase from *Arabidopsis thaliana* cell suspension culture. FEBS Lett 398: 243-247.
- Østergaard L, Teillum K, Mirza O, Mattsson O, Petersen M, Welinder KG, Mundy J, Gajhede M y Henriksen A.** 2000. *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. Plant Mol Biol 44: 231-243.
- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Uría MA, Fraile B, Anadón R, Sáez FJ y de Miguel MP.** 1997. Citología e histología vegetal y animal. Ed McGraw-Hill Interamericana.
- Passardi F, Cosio C, Penel C y Dunand C.** 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. Plant Cell Rep 24: 255-265.
- Passardi F, Longet D, Penel C y Dunand C.** 2004a. The plant peroxidase multigenic family in rice and its evolution in green plants. Phytochemistry 65: 1879-1893.
- Passardi F, Penel C y Dunand C.** 2004b. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. Trends Plant Sci 9: 534-540.
- Pati PK, Rath SP, Sharma M, Sood A y Ahuja PS.** 2006. *In vitro* propagation of rose – a review. Biotechnol Adv 24: 94-114.
- Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, Surman C, Newman LJ, Smith C, Devan MW, Mansfield S, Whetten RW, Sderoff RR y Campbell MM.** 2003. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. Plant J 36: 743-754.
- Pearson WR.** 1990. Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. Methods in Enzymology 183: 63-98.
- Peck SC.** 2005. Update on proteomics in *Arabidopsis*, where do we go from here? Plant Physiol 138: 591-599.
- Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2000. Inhibition by ferulic acid of the oxidase activity of a cell wall-located basic peroxidase involved in lignification in *Z. elegans*. Plant Peroxidase Newslett 14: 41-47.
- Pedreño MA, Bernal MA, Calderón AA, Ferrer MA, López-Serrano M, Merino de Cáceres F, Muñoz R y Ros Barceló A.** 1993. A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in *Vitaceae*, *Solanaceae* and *Leguminosae*. En Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology, eds KJ Welinder, SK Rasmussen, C Penel y H Greppin, Universidad de Ginebra, Ginebra pp 307-314.
- Peskan T, Pedreño MA, Krsnik-Rasol M y Muñoz R.** 1997. Subcellular localisation and polymorphism of peroxidase in horseradish tumour and teratoma tissue. Biol Plant 39: 575-582.
- Pesquet E, Ranocha P, Legay S, Digonnet C, Barbier O, Pichon M y Goffner D.** 2005. Novel markers of xylogenesis in *Zinnia* are differentially regulated by auxin and cytokinin. Plant Physiol 139: 1821-1839.
- Peter G y Neale D.** 2004. Molecular basis for the evolution of xylem lignification. Curr Opin Plant Biol 7: 737-742.



- Pitarch A, Sánchez M, Nombela C y Gil C.** 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics* 1: 967-982.
- Polle A, Otter T y Seifert F.** 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol* 106: 53-60.
- Pomar F, Merino F y Ros Barceló A.** 2002. O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma* 220: 17-28.
- 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.
- Popper ZA y Fry SC.** 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Ann Bot* 91: 1-12.
- Pryer KM, Schneider H, Zimmer EA y Banks JA.** 2002. Deciding among green plants for whole genome studies. *Trends Plant Sci* 7: 550-554.
- Pua E y Lee Y.** 2003. Expression of a ripening-related cytochrome P450 cDNA in Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Williams). *Gene* 305: 133-140 .
- Qiu YL, Lee J, Bernasconi-Quadroni F, Soltis DE, Soltis PM, Zanis M, Zimmer EA, Chen Z, Savolainen V y Chase MW.** 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402: 404-407.
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milrad de Forchetti S, Tigier H y Valpuesta V.** 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1127.
- Rabilloud T.** 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics* 2: 3-10.
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, van de Peer Y y Boerjan W.** 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 1051-1071.
- Ralph J, Bunzel M, Marita JM, Hatfield RD, Lu F, Kim H, Schatz PF, Grabber JH y Steinhart H.** 2004a. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Rev* 3: 79-96.
- Ralph J, Grabber JH y Hatfield RD.** 1995. Lignin- ferulate crosslink in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr Res* 275: 167-178.
- Ralph J, Hatfield RD, Quideae S, Helm RF, Grabber JH y Jung HJG.** 1994. Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J Am Chem Soc* 116: 9448-9456.
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH y Boerjan W.** 2004b. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Rev* 3: 79-96.
- Ralph J, Peng J, Lu F, Hatfield RD y Helm RF.** 1999. Are lignins optically active? *J Agr Food Chem* 47: 2991-2996.

- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet AM y Goffner D.** 2002. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol*: 129 145-155.
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Macheteau MC, 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.
- Rapoport TA.** 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258: 931-936.
- Rashid A.** 1988. Cell physiology and genetics of higher plants, vol. I. CRC Pres, Boca Raton, FL.
- Regalado AP, Pinheiro C, Vidal S, Chaves I, Ricardo CPP y Rodrigues-Pousada C.** 2000. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, *IF3*, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. *Planta* 210: 543-550.
- 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.
- Robert D, Mollard A y Barnoud F.** 1989. C-13 NMR qualitative and quantitative study of lignin structure synthesized in *Rosa-glauca* calluses. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 297-304.
- Roberts AW y Haigler CH.** 1994. Cell expansion and tracheary element differentiation are regulated by extracellular pH in mesophyll cultures of *Zinnia elegans* L. *Plant Physiol* 105: 699–706.
- Roberts K y McCann MC.** 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. *Curr Opin Plant Biol* 3: 517-522.
- Robertson D, Mitchell GP, Gilroy JS, Gerrish C, Bolwell GP y Slabas AR.** 1997. Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J Biol Chem* 272: 15841-15848.
- Robertson L, Robertson WM, Sobczak M, Helder J, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Ferguson MA, Fairlamb A y Jones JT.** 2000. Cloning, expression and functional charcterisation of a peroxiredoxin from the potato cyst nematode *Globodera rostochinensis*. *Mol Biochem Parasitol* 111: 41-49.
- Rodriguez M, Ringstad L, Schafer P, Just S, Hofer HW, Malmsten M y Siegel G.** 2007. Reduction of atherosclerotic nanoplaque formation and size by *Ginkgo biloba* (EGb 761) in cardiovascular high-risk patients. *Atherosclerosis* 192: 438-44.
- Rodríguez-Marañón MJ y van Huystee RB.** 1994. Plant peroxidases: interaction between their prosthetic groups. *Phytochemistry* 37: 1217-1225.
- Rogers LA y Campbell MM.** 2004. The genetic control of lignin deposition Turing plant growth and development. *New Phytol* 164: 17-30.
- Rogers LA, Dubos C, Surman C, Willment J, Cullis IF, Mansfield SD y Campbell MM.** 2005. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytol* 168: 123-140.
- Ros Barceló A y Muñoz R.** 1989. Epigenetic control of a cell wall scopoletin peroxidase by lupisoflavone in *Lupinus*. *Phytochemistry* 28: 1331-1333.

- Ros Barceló A y Muñoz R.** 1992 Peroxidases: their role in the control of plant cell growth. *In*: Penel, C., Gaspar, T. y Greppin, H. (eds), Plant Peroxidases 1980-1990. Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical and Physiological Aspects. Univ. of Geneva, Switzerland, pp. 71-89.
- Ros Barceló A y Pomar F.** 2001. Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. *Phytochemistry* 57: 1105-1113.
- Ros Barceló A y Pomar F.** 2003. Xylem parenchyma cells deliver the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necessary for the polymerisation of cinnamyl alcohols in the secondary cell wall of xylem vessels as another example of cell-to-cell cooperation during lignin biosynthesis. En "Plant Biology 2003 -Annual Meeting of the American Society of Plant Biologists" pp 258 Honolulu, Hawaii USA.
- Ros Barceló A, Ferrer MA, García-Florenciano E y Muñoz R.** 1991. The tonoplast localization of two basic isoperoxidases of high pI in *Lupinus*. *Bot Acta* 104: 272-278.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV y Esteban Carrasco A.** 2007. Looking for syringyl peroxidases. *Trends Plant Sci* 12: 486-491.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS y Pedreño MA.** 2004. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? *Phytochemistry Rev* 3: 61-78.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Ferrer MA y Hernández JA.** 2006. The apoplastic antioxidant enzymatic system in the wood-forming tissues of trees. *Trees* 20: 145-156.
- Ros Barceló A, Morales M y Pedreño MA.** 1997. Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. En *Lignin and Lignan Biosynthesis*, N.G. Lewis y S. Sarkanen, eds, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington 697: 84-95.
- Ros Barceló A, Muñoz R y Sabater F.** 1987. Lupin peroxidases I. Isolation and characterization of cell wall bound isoperoxidase activity. *Physiol Plant* 71: 448-454.
- Ros Barceló A, Muñoz R y Sabater F.** 1988a. Lupin peroxidases III. Subcellular location of membrane-bound acidic isoperoxidases. *Plant Physiol Biochem* 26: 575-583.
- Ros Barceló A, Paradiso A y Pomar F.** 2003a. Heterogeneity in lignin monomer composition between gymnosperms and angiosperms is satisfied by means of a multifunctional basic peroxidase isoenzyme responsible for the polymerization step. En "12<sup>th</sup> International Symposium on Wood and Pulping Chemistry" pp 253-256, Madison, Wisconsin USA.
- Ros Barceló A, Pedreño MA, Muñoz R y Sabater F.** 1988b. Lupin peroxidases. II. Binding of acidic isoperoxidases to cell walls. *Physiol Plant* 73: 238-244.
- Ros Barceló A, Pomar F y Pedreño MA.** 2000. Competitive inhibitor-dissected histochemistry of the peroxidase responsible for syringyl lignin biosynthesis in *Z. elegans* xylem. *Aust J Plant Phys* 27: 1101-1107.
- Ros Barceló A, Pomar F, López-Serrano M y Pedreño MA.** 2003b. Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Funct Plant Biol* 30: 577-591.
- Ros Barceló A, Pomar F, López-Serrano M, Martínez P y Pedreño MA.** 2002. Developmental regulation of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiol Biochem* 40: 325-332.

- Ros Barceló A.** 1995. Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma* 186: 41-44.
- Ros Barceló A.** 1997. Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* 176: 87-132.
- Ros Barceló A.** 1998a. The generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta* 207: 207-216.
- Ros Barceló A.** 1998b. Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Ann Bot* 82: 97-103.
- Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, Jahn MM y Saravanan RS.** 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles, and experimental tools. *Plant J* 39: 715-733.
- Ruel K, Montiel MD, Goujon T, Jouanin L, Burlat V y Joseleau JP.** 2002. Interrelation between lignin deposition and polysaccharide matrices during the assembly of plant cell walls. *Plant Biol* 4: 2-8.
- Sablowski RW, Moyano E, Culianez-Macia FA, Schuch W, Martin C y Bevan M.** 1994. A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthesis genes. *EMBO J* 13: 128-137.
- Sacks OW.** 1997. *En La Isla de los Ciegos al Color*. Anagrama (1999). Barcelona, España.
- Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM y Bressan RA.** 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol* 117: 465-472.
- Samac DA y Shah DM.** 1991. Developmental and pathogen-induced activation of the *Arabidopsis* acidic chitinase promoter. *Plant Cell* 3: 1063-1072.
- Samuels AL, Rensing KH, Douglas CJ, Mansfield SD, Dharmawardhana DP y Ellis BE.** 2002. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* 216: 72-82.
- 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.
- Santos IS, Da Cunha M, Machado OLT y Gomes VM.** 2004. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L seeds: purification, characterisation and immunolocalisation. *Plant Sci* 167: 1203-1210.
- Sato Y, Sugiyama M, Komamine A y Fukuda H.** 1995a. Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. *Planta* 196: 141-147.
- Sato Y, Sugiyama M, Takagi T y Fukuda H.** 1995b. Purification of cationic peroxidases bound ionically to the cell walls from the roots of *Zinnia elegans*. *J Plant Res* 108: 463-468.
- Sato Y, Watanabe T, Komamine A, Hibino T, Shibata D, Sugiyama M y Fukuda H.** 1997. Changes in the activity and mRNA of cinnamyl alcohol dehydrogenase during tracheary element differentiation in *Zinnia*. *Plant Physiol* 113: 425-430.
- Savitsky PA, Gazaryan IG, Tishkov VI, Lagrimini LM, Ruzgas T y Gorton L.** 1999. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochem J* 340: 579-783.

- Schevchenko A, Wilm M, Vorm O y Mann M.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-858.
- Schlesier B, Berna A, Bernier F y Mock HP.** 2004. Proteome analysis differentiates between two highly homologous germin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Ws-2. *Phytochemistry* 65: 1565-1574.
- Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H y Lamport DTA.** 1996. Isolation of pI 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J* 9: 477-489.
- Schultz CJ, Ferguson KL, Lahnstein J y Bacic A.** 2004. Post-translational modifications of arabinogalactan-peptides of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279: 45503-45511.
- Schumacher K, Vafeados D, McCarthy M, Sze H, Wilkins T y Chory J.** 1999. The *Arabidopsis* det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H(Ca<sup>+</sup>)-ATPase in plant growth and development. *Genes Develop* 13: 3259-3270.
- Schweizer P, Christoffel A y Dudler R.** 1999. Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistant. *Plant J* 20: 541-552.
- Sedaa K, Bjur R, Shinozuka K y Westfall D.** 1990. Nerve and drug induced release of adenine nucleosides and nucleotides from rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 1060-1067.
- Sederoff R, Campbell M, O'Malley D y Whetten R.** 1994. Genetic regulation of lignin biosynthesis and the potential modification of wood by genetic engineering in loblolly pine. En "Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism" (BE Ellis, eds.) pp 313-355, New York, Plenum Press.
- Segarra CI, Casalongué CA, Pinedo ML, Ronchi VP y Conde RD.** 2003. A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. *J Exp Bot* 54: 1335-1341.
- Shen S, Jing Y y Kuang T.** 2003. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics* 3: 527-535.
- Shigeoka S, Nakano Y y Kitakoa S.** 1980. Purification and properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis*. *Z. Arch Biochem Biophys* 201: 121-127.
- Shin M y Nakamura W.** 1961. Hemoproteins of wheat germ. *J Biochem* 50: 500-507.
- Siegel BZ.** 1993. Plant peroxidases – an organismic perspective. *Plant Growth Regul* 12: 303-312.
- Slabas AR, Ndimba B, Simon WJ y Chivasa S.** 2004. Proteomic analysis of the *Arabidopsis* cell wall reveals unexpected proteins with new cellular locations. *Biochem Soc Trans* 32: 524-528.
- Smith A y Veitch NC.** 1998. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr Opin Chem Biol* 2: 269-278.
- Smith TF y Waterman MS.** 1981. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 147: 195-197.
- Sohier C.** 2002. Plant biotechnology: an avant-garde research for an ancestral tree, the Ginkgo. *Ann Pharm Fr* 60: 22-27.
- Sottomayor M y Ros Barceló A.** 1997. What can we learn from  $\alpha$ -3', 4'-anhydrovinblastine synthase? *Recent Res Develop Phytochem Vol I*, SG Pandalai, ed Research Signpost, India 1: 225-233.

- Sottomayor M, de Pinto MC, Salema R, DiCosmo F, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 1996. The vacuolar localization of a basic peroxidase isoenzyme responsible for the synthesis of  $\alpha$ -3',4'-anhydrovinblastine in *Catharanthus roseus* (L.) Don leaves. *Plant Cell Environ* 19: 761-767.
- Sperry JS, Hacke UG y Wheeler JK.** 2005. Comparative analysis of end wall resistivity in xylem conduits. *Plant Cell Environ* 28: 456-465.
- Stacey NJ, Roberts K, Carpita NC, Wells B y McCann MC.** 1995. Dynamic changes in cell surface molecules are very early events in the differentiation of mesophyll cells from *Zinnia elegans* into tracheary elements. *Plant J* 8: 891-906.
- Steinmacher DA, Krohn NG, Dantas AC, Stefenon VM, Clemente CR y Guerra MP.** 2007. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. *Ann Bot* 100: 699-709.
- Sterjiades R, Dean JFD y Eriksson KEL.** 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol* 99: 1162-1168.
- Sterjiades R, Dean JFD, Gamble G y Himmelsbach DS.** 1993. Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures. Reactions with monolignols and lignin model compounds. *Planta* 190: 75-87.
- Stracke R, Weber M y Weisshaar B.** 2001. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 4: 447-456.
- Strivastava LM.** 1966. Histochemical studies on lignin. *Tappi* 49: 173-183.
- Takahama U.** 1993. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolic by ascorbic acid: Different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol* 34: 809-817.
- Takahama U.** 1995. Oxidation of hydroxycinnamic acid and hydroxycinnamyl alcohol derivatives by laccase and peroxidase. Interactions among *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl groups during the oxidation reactions. *Physiol Plant* 93: 61-68.
- Tamagnone L, Merida A, Parr A, Mackay S, Culianez-Macis FA, Roberts K y Martin C.** 1998. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* 10: 135-154.
- Tams JW y Welinder KG.** 1995. Mild chemical deglycosylation of horseradish peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme. *Anal Biochem* 228: 48-55.
- Tchorbadjieva MI y Pantchev IY.** 2006. Secretion of a chitinase-like protein in embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. *Biol Plantarum* 50: 142-145.
- Teichmann T, Guan C, Kristoffersen P, Muster G, Tietz O y Palme K.** 1997. Cloning a biochemical characterization of an anionic peroxidase from *Zea mays*. *Eur J Biochem* 247: 826-832.
- Terahisma N, Atalla RH, Ralph SA, Landucci LL, Lapierre C y Monties B.** 1995. New preparations of lignin polymer models under conditions that approximate cell wall lignification. I. Synthesis of novel polymer models and their structural characterization by  $^{13}\text{C}$  NMR. *Holzforschung* 49: 521-527.

- 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 cell wall of tree xylem as studied by microautoradiography. En “Plant Cell Wall Polymers: Biogenesis and Biodegradation” (Lewis NG, Paice, eds) ACS Symp Series 399:160-168 Am Chem Soc, Washington DC.
- Terashima N, Atalla RH, Ralph SA, Landucci LL, Lapierre C y Monties B.** 1996. New preparations of lignin polymer models under conditions that approximate cell wall lignification. II. Structural characterization of the models by thioacidolysis. *Holzforschung* 50: 9–14.
- Thaker VS, Saroop S, Vaishnav PP y Singh D.** 1986. Role of peroxidase and esterase activities during cotton fiber development. *Plant Growth Regul* 5: 17-27.
- Theorell H.** 1947. Heme-linked groups and mode of action of some hemoproteins. *Adv Enzymol* 7: 265-303.
- Thomas C, Rajagopal A, Windsor B, Dudler R, Lloyd A y Roux SJ.** 2000. A role for ectophosphatase in xenobiotic resistance. *Plant Cell* 12: 519-533.
- Thompson J, Higgins D, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressively multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Thordahl-Christensen H, Zhang Z, Wei Y y Collinge DB.** 1997. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: accumulation in papillae and hypersensitive response during powdery-mildew interaction. *Plant J* 11: 1187-1194.
- Thorpe TA.** 1980. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. *Int Rev Cytol Suppl* 11: 71-112.
- Tognolli M, Penel C, Greppin H y Simon P.** 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.
- Tokunaga N, Sakakibara N, Umezawa T, Ito Y, Fukuda H y Sato Y.** 2005. Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 46: 224-232.
- Torii KU.** 2004. Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol* 234: 1-46.
- Tsutsumi Y, Matsui K y Sakai K.** 1998. Substrate-specific peroxidases in woody angiosperms and gymnosperms participate in regulating the dehydrogenative polymerization of syringil and guaiacyl type lignins. *Holzforschung* 52: 275-281.
- Tsutsumi Y, Nishida T y Sakai K.** 1994. Lignin biosynthesis in woody angiosperm tissues III. Isolation of substrate-specific peroxidases related to the dehydrogenative polymerization of sinapyl and coniferyl alcohols from *Populus* callus cultures. *Mokuzai Gakkaishi* 40: 1348-1354.
- Tyson H y Dhindsa R.** 1995. Codon usage in plant peroxidase genes. *DNA Seq* 5: 339-351.
- Ubeda-Tomas S, Edvardsson E, Eland C, Kumar Singh S, Zadik D, Aspeborg H, Gorzsàs A, Teeri TT, Sundberg B, Persson P, Bennett M y Marchant A.** 2007. Genomic-assisted

- identification of genes involved in secondary growth in *Arabidopsis* utilising transcript profiling of poplar wood-forming tissues. *Physiol Plantarum* 129: 415-428.
- Udagama-Randeniya PVU y Savidge RA.** 1995. Coniferyl alcohol oxidase- a catechol oxidase? *Trees* 10: 102-107.
- Valerio L, De Meyer M, Penel C y Dunand C.** 2004. Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry* 65: 1331-1342.
- Vallelian-Bindschedler L, Mosinger E, Métraux JP y Schweizer P.** 1998. Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (*Hordeum vulgare* L.) that is insolubilized in stressed leaves. *Plant Mol Biol* 37: 297-308.
- van Huystee RB y Tam ASK.** 1988. Peptides released by cultured peanut cells during growth. *J. Plant Physiol* 133: 645-647.
- Vanden Driessche T, Kevers C, Gaspar T y Caubergs R.** 1984. Peroxidases in *Acetabularia*: their possible role in development. *Differentiation* 27: 175-181.
- Vanisree M, Lee C, Lo S, Nalawade S, Lin C y Tsay H.** 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue cultures. *Bot Bull Acad Sin* 45: 1-22.
- Varner JE y Lin LS.** 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239.
- Veitch NC.** 2004. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Rev* 3: 3-18.
- Vitale A y Denecke J.** 1999. The endoplasmic reticulum—gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* 11: 615-628.
- Volpert R, Osswald W y Etsyner EF.** 1995. Effects of cinnamic acids derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochemistry* 38: 19-22.
- von Heijne G.** 1990. The signal peptide. *J Membr Biol* 115: 195-201.
- Wagley LM, Galdfelter HJ y Phillips GC.** 1987. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* *in vitro*. II. Macro- and micro-photographic evidence of de novo regeneration. *Plant Cell Rep* 6: 167-171.
- Wakamatsu K y Takahama U.** 1993. Changes in peroxidase activity and in peroxidase isozymes in carrot callus. *Physiol Plant* 88: 167-171.
- Wallace G y Fry SC.** 1999. Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry* 52: 769-773.
- Wang BS, Hu Q, Sommerfeld M y Chen F.** 2004. Cell wall proteomics of the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Proteomics* 4: 692-708.
- Wang O y Perl A.** 2006. Cryopreservation of embryogenic cell suspension by encapsulation – vitrification. *Methods Mol Biol* 318: 77-86.
- Watson BS, Lei Z, Dixon RA y Sumner LW.** 2004. Proteomics of *Medicago sativa* cell walls. *Phytochemistry* 65: 1709-1720.
- Weger HG.** 1997. Interactions between Cu(II), Mn(II) and salicylhydroxamic acid in determination of algal peroxidase activity. *Phytochemistry* 46: 195-201.
- Weisshaar B y Jenkins GI.** 1998. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* 1: 251-257.



- Welinder K.** 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.
- Welinder KG, Justesen AF, Kjærsgård IVH, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM y Duroux L.** 2002 Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 269: 6063-6081.
- Whetten R y Sederoff RR.** 1995. Lignin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1001-1013.
- Wilson IBH.** 2002. Glycosilation of proteins in plants and invertebrates. *Curr Opin Struct Biol* 12: 569-577.
- Wrigley CW.** 1971. Gel electrofocusing. *Method Enzimol* 22: 55-564.
- Xu Z, Escamilla-Treviño L, Zeng L, Lalgondar M, Bevan D, Winkel B, Mohamed A, Cheng CL, Shih MC, Poulton Jn y Esen A.** 2004. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol Biol* 55: 343-367.
- Yamazaki I, Nakajima R y Yokota K.** 1966. Reversible conversion of horseradish paraperoxidase (low spin) into normal peroxidase (high spin) by sulfhydryl reagents. *Biochem Biophys Res Commun* 23: 566-569.
- Yamazaki I, Nakajima R, Honma H y Tamura M.** 1967. Cyanide as a possible ligand of low-spin peroxidases in plant tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 27: 53-58.
- Yang BY, Gray JSS y Montgomery R.** 1996. The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Res* 287: 203-212.
- Yokoyama R y Nishitani K.** 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis thaliana* genes involved in xylem secondary cell walls. *J Plant Res* 119: 189-194.
- Yoshida K, Kaothien P, Matsui T, Kawaoka A y Shinmyo A.** 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 665-670.
- Zhang Z, Collinge DB y Thordal-Christensen H.** 1995. Germin-like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J* 8: 139-145.
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B y Zhang L.** 2004. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol* 134: 849-857.
- Zheng X y van Huystee RB.** 1992. Peroxidase regulated elongation of segments of peanut hypocotyls. *Plant Sci* 81: 47-56.
- Zhong R, Kays SJ, Schroeder BP y Ye ZH.** 2002. Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. *Plant Cell* 14: 165-179.
- Zhong R, Taylor JJ y Ye ZH.** 1997. Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 9: 2159-2170.
- Zhong RQ, Ripberger A y Ye ZH.** 2000. Ectopic deposition of lignin in the pith of stems of two *Arabidopsis* mutants. *Plant Physiol* 123: 59-69.
- Zhou Z y Zhen S.** 2003. The missing link in Ginkgo evolution. *Nature* 423: 821-822.
- Zhu J, Chen S, Alvarez S, Asirvatham VS, Schachtman DP, Wu Y y Sharp RE.** 2006. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. *Plant Physiol* 140: 311-325.



*Anexos*



## Anexo 1. Abreviaturas

<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>4-MN</b>	4-metoxi- $\alpha$ -naftol
<b>AIA</b>	Ácido 3-indolacético
<b>ANA</b>	Ácido 1-naftalenacético
<b>BA</b>	Benciladenina
<b>BSTFA</b>	N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
<b>CAD</b>	Coniferil alcohol deshidrogenada
<b>CAPS</b>	Ácido 3-[Ciclohexilamino]-1-propano-sulfónico
<b>Con</b>	Conductividad
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>DHCA</b>	Alcohol dihidroconiferílico
<b>EST</b>	Fragmentos de secuencias expresadas
<b>G</b>	Guayacilo
<b>H</b>	<i>p</i> -hidroxifenilo
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque
<b>PAL</b>	Fenilalanina amonioliasa
<b>PCV</b>	Volumen de empaquetamiento celular
<b>PF</b>	Peso fresco
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>PS</b>	Peso seco
<b>PVPP</b>	Polivinilpolipirrolidona
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>S</b>	Siringilo
<b>SDS</b>	Sodio docedil sulfato
<b>Syr</b>	Siringaldazina
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina-HCl
<b>V<sub>T</sub></b>	Volumen total

## Anexo 2. Secuencias de aminoácidos de peroxidasa obtenidas de las bases de datos

**Nº acceso:** ZePrx15 PeroxiBase (Q4W1I8 UniProtKB)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=2626>

**Fuente:** *Zinnia elegans*

**Taxonomía:** *Zinnia elegans*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Heliantheae; Zinnia.

**Referencia:**

Gabaldon, C., Lopez-Serrano, M., Pedreno, M.A. and Barcelo, A.R. Cloning and Molecular Characterization of the Basic Peroxidase Isoenzyme from *Zinnia elegans*, an Enzyme Involved in Lignin Biosynthesis, *Plant Physiol.* 139 (3), 1138-1154 (2005)

**Secuencia de la proteína:**

"MSYHKSSGTILMVPLFMLLISVNYFMSCNAQLSTTFYD TTCPTALSTIRTSIRSSVSSNRRNAALVIRLLFHDC  
FVQGCDA S L L L S G A G S E R A S P A N D G V L G Y E V I D A A K A A V E R V C P G V V S C A D I L A V A A R D A S V A V G G P S W T V R L G R  
R D S T T S N A A Q A A T D L P R G N M V L S Q L I S N F A N K G L N T R E M V A L S G S H T L G Q A R C I R F R G R I Y N S T L R I E P N F N R S L  
S Q A C P P T G N D A T L R P L D L V T P N S F D N N Y R N L V T S R G L L I S D Q V L F N A D S T D S I V T E Y V N N P A T F A A D F A A M V K  
M S E I G V V T G T S G I V R T L C G N P S"

**Nº acceso:** CruPrx01 PeroxiBase (CB092898 NCBI)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=1215>

**Definición:** 6 secuencias EST ensambladas por el equipo de PeroxiBase(CB092896, CB092898, CB089844, CB093006, DR062285 y DR061703). El extremo 3' se completó con CycadOVNORM954.seq (Vicogenta).

**Fuente:** *Cycas rumphii*

**Taxonomía:** *Cycas rumphii*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Cycadophyta; Cycadales; Cycadaceae; Cycas.

**Referencia:**

Brenner, E.D., Katari, M.S., Dedhia, N.N., O'Shaughnessy, A.L., Baliya, V., Martienssen, R.A., McCombie, R.W., Benfey, P., Coruzzi, G. and Stevenson, D. (2003) Expressed tag sequences from *Cycas ovule* (NYBG). No publicado.

**Secuencia de la proteína:**

```
"MALRVLVLCVVSLVFVGRNGVEGSLVMNFYEDSCPQAEDIVREQVRLLYKRHKNTAFSWLRNIFHDCFVESCD
ASLLLDSTRKSMSEKETDRSFGLRNFKYLDTIKEAVERECPGVVSCADILVLSARDGIVSLGGPYIPLKTGRRDG
RKSRANVVENYLPDHNSISTVLSRFADIGIDTPGVVALLGAHSVGRTHCVKLVHRLYPDVPDPTLDPAAHEMKW
KCPDAIPNPKAVQYVRNDRGTPMKLDNNYYRNLNENKGLLIVDQQLYADSRTRRHVKKMAKDQGYFFTHFARALA
ILSENNPLTGTRGEIRKHCSSVNKLH "
```

**Nº acceso:** GbPrx01 PeroxiBase (CB074963 NCBI)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=1162>

**Definición:** 18 secuencias ESTs (CB074963, CB074995, CB075751, CB075725, CB075583 del NCBI y ik79d07.bl.b, ip73g05.gl.b, ip74e05.gl.b, ik81b07.bl.b, ip83c11.gl.b, hx13b04.b2.b, ip74e10.gl.b, hx13f05.b2.b, hz50h03.bl.b, hz50e08.bl.b, ik96f02.bl.b, hz47g11.bl.b, ip73e07.gl.b de la base de datos Vicogenta). Ensambladas por el equipo de PeroxiBase. Falta el extremo inicial de la secuencia.

**Fuente:** *Ginkgo biloba*

**Taxonomía:** *Ginkgo biloba*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Ginkgophyta; Ginkgoales; Ginkgoaceae; Ginkgo.

**Referencia:**

Brenner, E.D., Twigg, R.W., Runko, S.J., Katari, M.S., Dedhia, N.N., O'Shaughnessy, A.L., Baliya, V., Martienssen, R.A., McCombie, R.W., Benfey, P., Coruzzi, G. and Stevenson, D. Expressed tag sequences from Ginkgo megasporophyll. No publicado.

**Secuencia de la proteína:**

"GTRDSCPQAEDIIREQVGLLYKHKHNTAFSWLRNIFHDCFVESCDA SLLLDSTRKSMSEKETDRSFGLRNFRLDTIKEAVERECPGVVSCADILVLSARDGVVSLGGPFIP LKTGRRDGRKSRANVVEDHLPDHNESISTVLSRFQAI GIDTPGVVALLGAHSVGRTHCVKLVHRLYPEVDPTLDAAHADYMKWKCPDAIPNPKAVQYVRNDRGTPMKLDNNY YRNLMENKGLLIVDQQLYDDPRTKRYVKKMAKSQDYFFQHFARALTILSENNPLTGTKGEIRKQCSMPNKLHGAQR"



**Nº acceso:** GbPrx02 PeroxiBase (DR064298 NCBI)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=1163>

**Definición:** 5 secuencias ESTs (DR063814 (5'), DR064298 (3'), CB094934, DR073290 and DR064059). Ensamblado por el equipo de PeroxiBase. Falta una pequeña parte del extremo 5'.

**Fuente:** *Ginkgo biloba*

**Taxonomía:** *Ginkgo biloba*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Ginkgophyta; Ginkgoales; Ginkgoaceae; Ginkgo.

**Referencia:**

Brenner, E.D., Twigg, R.W., Runko, S.J., Katari, M.S., Dedhia, N.N., O'Shaughnessy, A.L., Baliya, V., Martienssen, R.A., McCombie, R.W., Benfey, P., Coruzzi, G. and Stevenson, D. Expressed tag sequences from Ginkgo megasporophyll. No publicado.

**Secuencia de la proteína:**

"ERIDFFLRQDITQAAGILRLHFHDCFVQGCASVLLDGSASGPSEQDAPPNLTLRPKAFEIIDDIKKNVDAICS  
KTVSCADITALATRESVKKAGGPTYRVPLGRRDGLTFATRNVTLANLGPRSNATALIKAFQSKSLDTDLVALSG  
GHTIGIGHCSSFTNRLYPTQATSLNEFAQSLYRICPTSTTNSTTDLDVVRTPNVFDNKYYVDLVQNQVLFSDQT  
LLTNSETKKIVESFASNQTLFFQKFRAMIKMGQVSVLTGKQGEVRANCSARNPTSYSVISTVVDDEIVGVEDA  
LSAM"

**Nº acceso:** GbPrx03 PeroxiBase (DR064298 NCBI)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=1319>

**Definición:** 1 secuencia EST (base de datos Vicogenta ip70e07.g1.b). Faltan los extremos 5' y 3'.

**Fuente:** *Ginkgo biloba*

**Taxonomía:** *Ginkgo biloba*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Ginkgophyta; Ginkgoales; Ginkgoaceae; Ginkgo.

**Referencia:**

Brenner, E.D., Twigg, R.W., Runko, S.J., Katari, M.S., Dedhia, N.N., O'Shaughnessy, A.L., Baliya, V., Martienssen, R.A., McCombie, R.W., Benfey, P., Coruzzi, G. and Stevenson, D. Expressed tag sequences from Ginkgo megasporophyll. No publicado.

**Secuencia de la proteína:**

"ERIDFFLRQDITQAAGILRLHFHDCFVQGCASVLLDGSASGPSEQDAPPNLTLRPKAFEIIDDIKKNVDAICS  
KTVSCADITALATRESVKKAGGPTYRVPLGRRDGLTFATRNVTLANLPGPRSNVTALIKAFQSKSLDTTDLVALS  
GGHTIGIGHCSSFTNRLYPTQATSLNEFAQSLYRICPTSTTNSTTDLVVRTPNVFDNKYYVDLVQNQVLF'TSDQ  
TLLTNSET"

**Nº acceso:** GbPrx04 PeroxiBase (DR064716 NCBI)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=13120>

**Definición:** 2 secuencias ESTs (DR064716 y DR065288). Ensamblado por el equipo de PeroxiBase. Falta el extremo 5'.

**Fuente:** *Ginkgo biloba*

**Taxonomía:** *Ginkgo biloba*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Ginkgophyta; Ginkgoales; Ginkgoaceae; Ginkgo.

**Referencia:**

Brenner, E.D., Twigg, R.W., Runko, S.J., Katari, M.S., Dedhia, N.N.,  
O'Shaughnessy, A.L., Baliya, V., Martienssen, R.A., McCombie, R.W., Benfey, P.,  
Coruzzi, G. and Stevenson, D. Expressed tag sequences from Ginkgo  
megasporophyll. No publicado.

**Secuencia de la proteína:**

"DSVVLTGGPSWPVQMGRDLSLTASKVTANNNIPAPSSNVATLISKFQNVGLTDEDMVTLSGAHTIGKARCSTFN  
NRLLNQAGTGS PDPTLQKEFLTSLQQLCLERVNNNNNTVTVLDLETPLTFDNQYYQNLASGEGLLNSDQVLFSSGG  
NTKQLVEYYIQNQEAFDQNFKTSMIRMGNIQPLTGTGDEIRRNCRFIN"

**Nº acceso:** GbPrx05 PeroxiBase (DR063640 NCBI)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=13121>

**Definición:** 3 secuencias ESTs (DR063640, DR073861 y DR074380). Ensamblado por el equipo de PeroxiBase. Falta el extremo 5'.

**Fuente:** *Ginkgo biloba*

**Taxonomía:** *Ginkgo biloba*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Ginkgophyta; Ginkgoales; Ginkgoaceae; Ginkgo.

**Referencia:**

Brenner, E.D., Twigg, R.W., Runko, S.J., Katari, M.S., Dedhia, N.N., O'Shaughnessy, A.L., Baliya, V., Martienssen, R.A., McCombie, R.W., Benfey, P., Coruzzi, G. and Stevenson, D. Expressed tag sequences from Ginkgo megasporophyll. No publicado.

**Secuencia de la proteína:**

"LPTVNMTVDQLTSLFRSKGLSQADMVTLSSGHTVGF AHCNEFMRYIYNFNKTYDIDPTMNPKYAMRLRASCPRD  
GFDPTVVAFNDVSTPTAFDNAYYQNAQRGLALLATDQLLFADIRTRGYVNSFAKSKQTFNFVSMIRLGNVGV  
KTGNQGEIRRDCGVFN"

**Nº acceso:** GbPrx06 PeroxiBase (DR064878 NCBI)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=13122>

**Definición:** 1 secuencia de EST y secuencia ip87d06.gl.b de la base de datos Vicogenta. Falta el extremo 3'.

**Fuente:** *Ginkgo biloba*

**Taxonomía:** *Ginkgo biloba*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Ginkgophyta; Ginkgoales; Ginkgoaceae; Ginkgo.

**Referencia:**

Brenner, E.D., Twigg, R.W., Runko, S.J., Katari, M.S., Dedhia, N.N., O'Shaughnessy, A.L., Baliya, V., Martienssen, R.A., McCombie, R.W., Benfey, P., Coruzzi, G. and Stevenson, D. Expressed tag sequences from Ginkgo megasporophyll. No publicado.

**Secuencia de la proteína:**

"MAINVRILFLLMLMCALATTRACLRGFLKPDHYQWTCPEAEAI VFAGVEKAVAQEARMAASLLRLHFHDCFVNG CDASVLLDDTVFFFTGEKTATPNANSLRGFEVIDSIKEELEFLCPGTVSCADILAI AARDSV"

**Nº acceso:** GbPrx07 PeroxiBase (DR074673 NCBI)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=13123>

**Definición:** 1 secuencia de EST (secuencia ik98f12.g1 de la base de datos Vicogenta). Falta gran parte del extremo 5'.

**Fuente:** *Ginkgo biloba*

**Taxonomía:** *Ginkgo biloba*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Ginkgophyta; Ginkgoales; Ginkgoaceae; Ginkgo.

**Referencia:**

Brenner, E.D., Twigg, R.W., Runko, S.J., Katari, M.S., Dedhia, N.N., O'Shaughnessy, A.L., Baliya, V., Martienssen, R.A., McCombie, R.W., Benfey, P., Coruzzi, G. and Stevenson, D. Expressed tag sequences from Ginkgo megasporophyll. No publicado.

**Secuencia de la proteína:**

"KCPRSGGDNKTTPLDLVSPTTFDTHYYLNLESGRGLLNSDQILYSTKGSETKALVKYYATHTEAFFHQFAISMI  
NMGNITPLTGSERGEIRKNCRKMN"

**Nº acceso:** GbPrx08 PeroxiBase (CB094345 NCBI)

**URL:**

<http://peroxibase.isb-sib.ch/listing.php?action=view&id=13124>

**Definición:** 1 secuencia de EST (secuencia hx18h02.b1.b de la base de datos Vicogenta). Falta gran parte del extremo 5'.

**Fuente:** *Ginkgo biloba*

**Taxonomía:** *Ginkgo biloba*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Ginkgophyta; Ginkgoales; Ginkgoaceae; Ginkgo.

**Referencia:**

Brenner, E.D., Twigg, R.W., Runko, S.J., Katari, M.S., Dedhia, N.N.,  
O'Shaughnessy, A.L., Baliya, V., Martienssen, R.A., McCombie, R.W., Benfey, P.,  
Coruzzi, G. and Stevenson, D. Expressed tag sequences from Ginkgo  
megasporophyll. No publicado.

**Secuencia de la proteína:**

"KGLLHSDQELFNGGSTVSVQVNSSASNSKSFFTFACAMVKMGNIKPLTGTNGQIRSNCRKP"

### Anexo 3. Resultado de la búsqueda de péptidos trípticos en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.

#### 3.1. Resultado de la búsqueda del péptido de m/z = 1019,52 de *Ginkgo biloba* en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.

Coincidencia con: **gi|4760704: peroxidasa 3 [Scutellaria baicalensis]**

Masa nominal(Mr): **34338**; pI calculado: **8,87**

```
1 MASFVSEFST RLMLVLLLLIG VSNAQLSANF YNTTCPNLLT IIRNAVNSAV
51 SSDTRMGASL LRLHFHDCFV NGCDASVLLD DRTGFTGEKT AGPNANSLRG
101 FDVIDNIKTL VEGSCPNIIVS CSDILSVAAR DGVVAVGGPS WAVALGRRDS
151 TTASLNAANT QIPGPGLNLN ALITSFSNKG FTAREMVALS GSHTIGQARC
201 TTFRGRIYND TNINGAFATG LRANCPRSSG DNNLAPLDNV SPARFNNDYY
251 RNLIGLRGLL HSDQELFNNG TADAQVRAYS TNSAAFFNDF ANAMVKMSNL
301 SPLTGTNGQI RRNCRRTN
```

Masa esperada: **1019,9594**

Masa calculada: **1019,5287**

Secuencia: **RGFDVIDNIKT**

Búsqueda en el NCBI BLAST de **gi|4760704**

Nº acceso: BAA77389

Definición: peroxidase 3 [Scutellaria baicalensis].

Fuente: Scutellaria baicalensis

Taxonomía:

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; lamiids; Lamiales; Lamiaceae; Scutellarioideae; Scutellaria.

Referencia: Morimoto S, Tateishi N, Inuyama M, Taura F, Tanaka H, Shoyama Y (1999) Identification and molecular characterization of novel peroxidase with structural protein-like properties. J Biol Chem 274:26192-26198.



**Anexo 3.2. Resultado de la búsqueda del péptido de m/z = 1541,76 de *Ginkgo biloba* en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.**

Coincidencia con **gi|77548362: peroxidasa [*Oryza sativa* (grupo-cultivar japónica)]**

Masa nominal (Mr): **34696**; pI calculado: **6,87**

```

1 MAQPTSSARC SLVVMVVVVL AVAGGSSAQL SPSFYSSYSCP GVFDVAVKCGM
51 QSAIANEKRI GASIVRLFFH DCFVQGCDA LLLDDTASFT GEKMANPNNG
101 SVRGFEVIDA IKSAVETICP GVVSCADILA IAARDSVAIL GGPSWDVKVG
151 RRDSRTASLS GANNNIPPPT SGLANLTSLF AAQGLSQKDM VALSGSHTIG
201 QARCTNFRAH IYNETNIDSG FAMSRQSGCP RSSGSGDNNL APLDLQTPTV
251 FENNYKLV VKKGLLHSDQ ELFNGGATDA LVQSYISSQS TFFADFVTGM
301 IKMGDITPLT GSNGEIRKNC RRIN

```

**Masa esperada: 1543,34**

**Masa calculada: 1541,76**

**Secuencia: DMVALSGSHTIGQAR**

Búsqueda en el NCBI BLAST de **gi|77548362**

**Nº acceso:** ABA91159

**Definición:** peroxidase [*Oryza sativa* (grupo-cultivar japónica)]

**Fuente:** *Oryza sativa* (grupo-cultivar japónica)]

**Taxonomía:**

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP clade; Ehrhartoideae; Oryzeae; *Oryza*.

**Referencia:** The Rice Chromosomes 11 and 12 Sequencing Consortia. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications. *BMC Biol.* 3 (1), 20 (2005).

### 3.3. Resultado de la búsqueda del péptido de m/z = 1069,52 de *Cycas revoluta* en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.

Coincidencia con gi|55700907: precursor de peroxidasa de clase III [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]

Masa nominal (Mr): 38970; pI calculado: 6,65

```
1 MAAAAAVVAV SVYLLVCSAP AAATAAAVAK KPSYPPVAKG LSFHDHYKKSC
51 PQAEAIVFSF LRDAIGKDVG LAAALIRLHF HDCFVQGCD A SILLTKTPGG
101 PDGEQQAIPN ESLRPAAFKA VNDIRALLDR ACGRVWSCSD IVTLAARDSV
151 KLAGGPSYKV PLGRRDGLTS ATPSQVLGAL PPPTSHVPEL IAALAKLNL
201 AADLIALSGA HTVGIAHCTS FTGRLYPKQD GTMDKWFAGQ LKLTCPKNDT
251 ANTTVNDIRT PNAFDNKYYV DLQNRQGLFT SDQDLFVNAT TRPLVAEFAV
301 DQSAFFHQFV FSVVKMGQIQ VLTGSQGQIR ANCSVRNPGA ASADEELPWS
351 AAVETVVEAA ESIVL
```

Masa esperada: 1069,73

Masa calculada: 1069,52

Secuencia: YYVDLQNR

Búsqueda en el NCBI BLAST de gi|55700907

Nº acceso: CAH69262

**Definición:** class III peroxidase 20 precursor [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]

**Fuente:** *Oryza sativa* (japonica cultivar-group)

**Taxonomía:**

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP clade; Ehrhartoideae; Oryzeae; *Oryza*.

**Referencia:** The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65 (13), 1879-1893.

### 3.4. Resultado de la búsqueda del péptido de m/z = 1005,51 de *Cycas revoluta* en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.

Coincidencia con gi|8546851: peroxidasa [*Ipomoea batatas*]

Masa nominal (Mr): 35390; pI calculado: 5,30

```
1 MASFSPLLAM ALAIFIFSSH SNAQLSSTFY STTCPNVS AI VRTVVQQALQ
51 NDARIGGSLI RLHFHDCFVD GCDGSLLLDN NGTTIVSEKD ALPNTNSTRG
101 FDVVDNIKTA VENACPGVVS CVDILALASE SSVSLAGGPS WNVLLGRRDR
151 RTANQGGANT SLPSPFENLT NLTQKFTNVG LNVNDLVALS GAHTFGRAQC
201 RTFSPRLFNF SNTGNPDPTL NTTYLATLQQ ICPQGGSGFT VTNLDPTTPD
251 TFDNNYFSNL QTNRGLLQSD QELFSTSGAP TIAIVNNFSA NQTAFEFESV
301 QSMINMGNIS PLTGSNGEIR SNCRRPN
```

Masa esperada: 1005,71

Masa calculada: 1005,51

Secuencia: GFDVVDNIK

Búsqueda en el NCBI BLAST de gi|8546851

Nº acceso: CAB94692

Definición: peroxidase [*Ipomoea batatas*]

Fuente: *Ipomoea batatas*

Taxonomía:

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;  
Magnoliophyta; Eudicotyledons; Core Eudicotyledons; Asterids; Lamiids; Solanales;  
Convolvulaceae; Ipomoeae; *Ipomoea*.

Referencia: Cloning and characterization of cDNA coding for *Ipomoea batatas* peroxidase. No publicado.

### 3.5. Resultado de la búsqueda del péptido de m/z = 1617,85 y m/z = 1061,58 de *Cycas revoluta* en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.

Coincidencia con **gi|55057256**: peroxidasa [*Picea abies*]

Masa nominal (Mr): **39150**; pI calculado: **8,42**

```
1 MEKLMILCLF CTLWIACASR ENVLTLNSDP PLVNGLSWTF YKSSCPKLES
51 IVKQRIDFYI KQDITQAAGL LRLHFHDCFV QGCDGSVLLA GSTSGPSEQG
101 APPNLSLRAK AFEIINDIKS RVDKACKVVV SCADVTALAA KESVRAAGGP
151 QYRIPLGRRD SLKFATQNVV LANLPAPSSK VTTLIKAFAT KNLNVTDLVA
201 LSGGHTIGIG HCTSFTDRLY PKQDTTLNKS FAQRLYTACP PKTSSNTTVL
251 DIRTPNVFDN KYYVDLMNRQ GLFTSDQDLY SDSRTKAIVN DFALDQDLFF
301 EKFAVAMVKM GQLNVLTGSK GEIRSNCSVS NLASTSTVEV AAEDVIESYA
351 SFM
```

Masa esperada: **1617,99**

Masa calculada: **1617,85**

Secuencia: **MGQLNVLTGSKGEIR**

Masa esperada: **1060,76**

Masa calculada: **1061,58**

Secuencia: **AFEIINDIK**

Búsqueda en el NCBI BLAST de **gi|55057256**

Nº acceso: CAD92856

Definición: peroxidase [*Picea abies*]

Fuente: *Picea abies*

Taxonomía:

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta;  
Coniferopsida; Coniferales; Pinaceae; *Picea*.

**Referencia:** Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in lignifying xylem of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol. Biol.* 61(4-5), 719-732 (2006)

3.6. Resultado de la búsqueda de los péptidos de  $m/z = 1005,51$ ,  $m/z = 2467,33$  y  $m/z = 1507,81$  de *Cycas revoluta* en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.

Coincidencia con gi|32351452: peroxidasa de clase III [*Gossypium hirsutum*]

Masa nominal ( $M_r$ ): 35912; pI calculado: 9,33

```

1 MFMLGNTKMG SASSFSKFCL TLLLLVDVLG STNAQLSTNF YSKSCPNNLS
51 TVKSTVTSAI NKEARMGASL LRLFFHDCFV NGCDGSVLLD DTSSFTGEKN
101 ANPNRNSSRG FDVVDNIKSA VENVCPGVVS CADILAI AAR DSVEILGGPK
151 WAVKLGRDA RSASQSAANN GIPPPTS NLN RLTSRFNALG LSTRDLVALS
201 GAHTIGQARC TSFRARIYNE SNIDASFAQT RQRNCPRTTG SGDNNLAPLD
251 IQTPTSFDNN YFKNLISQRG LLHSDQQLFN GGSTDSIVRG YGNPSSSFNS
301 DFVAAMIKMG DISPLTGSRG EIRKNCRRVN

```

Masa esperada: 1005,59

Masa calculada: 1005,51

Secuencia: **GFDVVDNIK**

Masa esperada: 2468,59

Masa calculada: 2467,33

Secuencia: **FNALGLSTRDLVALSGAHTIGQAR**

Búsqueda en el NCBI BLAST de gi|32351452

Nº acceso: AAP76387

Definición: class III peroxidase [*Gossypium hirsutum*].

Fuente: *Gossypium hirsutum*

Taxonomía:

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Eudicotyledons; Core Eudicotyledons; Rosids; Eurosids II; Malvales; Malvaceae; Malvoideae; *Gossypium*.

Referencia: Class III peroxidases during HR of Cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Sin publicar.

**3.7. Resultado de la búsqueda del péptido de m/z = 2342,17 de *Cycas revoluta* en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.**

Coincidencia con **gi|1232069: peroxidasa catiónica [*Stylosanthes humilis*]**

Masa nominal (Mr): **34273**; pI calculado: **7,05**

1 MECGFYLVLA LVSLGVVNSV VHGGQTRVGF YSSTCPGVES IVRSTVQSHL  
51 NSDLTLAAGL LRMHFHDCFV HGCDASLLID GTNTEKTAPP NIGLRGFEVI  
101 DHAK**TQLEAA CPNVVSCADI LALAAR**DSVV LSGGASWQVP TGRRDGLVSS  
151 AFDVKLPGPG DSDVDVQKHKF SALGLNTKDL VTLVGGHTIG TTSCQLLSSR  
201 LNNFNGTNGP DPTIDPSFLP QLKALCPQDG GASTKRVPLD NGSQTKFDTS  
251 YFNNVRRGRG ILQSDQALWT DPSTKPFVQS YSLGSTFNVD FGNSMVKMGN  
301 IGVKTGSDGE IRKKCSAFN

**Masa esperada: 2342,34**

**Masa calculada: 2342,17**

**Secuencia: TQLEAACPNVSCADILALAAR**

Búsqueda en el NCBI BLAST de **gi|1232069**

**Nº acceso:** AAB67737

**Definición:** cationic peroxidase [*Stylosanthes humilis*]

**Fuente:** *Stylosanthes humilis*

**Taxonomía:**

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Eudicotyledons; Core Eudicotyledons; Rosids; Eurosids I; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Aeschynomeneae; *Stylosanthes*.

**Referencia:** Nucleotide sequence of a pathogen-inducible cationic peroxidase gene from *Stylosanthes humilis*. *Plant Physiol.* 111, 348 (1996)

### 3.8. Resultado de la búsqueda del péptido de m/z = 1550,97 de *Cycas revoluta* en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.

Coincidencia con gi|577503: peroxidasa

Masa nominal (Mr): 34393; pI calculado: 8,65

```
1 MALIVPISKV CFIIIFMCLNI GLGSGQLSSN FYATKCPNAL STIKSAVNSA
51 VSKEARLGAS LLRLHFHDCF VQGCDASVLL DDTSTFTGEEK TAFPNVNSAR
101 GFDVIDTIKS QVESLCPGVV SCADILALAA RDSVVALGGP SWNVQLGRRD
151 STTASLNSAN SDLPGPSFNL SGLISAFSCK GFTAKELVTL SGAHTIGQAR
201 CTTFRTRIYN ESNIDPSYAK SLQGNCPSVG GDSNLSPPFDV TTPNKFDNAY
251 YINLKNKKGL LHADQQLFNG GGSTDSQVTA YSNNAATFNT DFGNAMIKMG
301 NLSPLTGTSG QIRTNCRKTN
```

Masa esperada: 1550,97

Masa calculada: 1551,84

Secuencia: ELVTL SGAHTIGQAR

Búsqueda en el NCBI BLAST de gi|577503

Nº acceso: AAB02554

Definición: cationic peroxidase

Fuente: *Stylosanthes humilis*

Taxonomía:

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Eudicotyledons; Core Eudicotyledons; Rosids; Eurosids I; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Aeschynomeneae; *Stylosanthes*.

Referencia: Nucleotide sequence of a cationic peroxidase gene from the tropical forage legume *Stylosanthes humilis*. *Plant Physiol.* 108 (3), 1303-1304 (1995)

**3.9. Resultado de la búsqueda del péptido de m/z = 2285,15 de *Cycas revoluta* en el Mascot y su coincidencia en el NCBI BLAST.**

Coincidencia con **gi|1781334: peroxidasa [Spinacia oleracea]**

Masa nominal (Mr): **33617**; pI calculado: **7,12**

```
1 LANSAKSQLS IAYYASSCPQ AEGIVRSTVQ SHFNSDPTIA PGLLRHLHFHD
51 CFVQGCDA SI LISGTSSERT AFTNVGLKGF DVIDDAKAQV ESVCPGVVSC
101 ADILALAARD SVDLTGGPNW GVPLGRLDGK RSSASDAVNL PSPLESIAVH
151 RQKFADKGLN DHDLVTLVGA HTIGQTD CRF FQYRLYNFTP TGNADPSINQ
201 PNIAQLQTLC PKNGNGLTKV ALDRDSRTKF DVNFFKNIRD GNAVLESDQR
251 LWGDDATQAI VQNYAGNLRG LFGVRFNFDF PKAMVKMSGI GVKSGSDGEV
301 RKMCSKFN
```

**Masa esperada: 2285,27**

**Masa calculada: 2285,15**

**Secuencia: AQVESVCPGVVSCADILALAAR**

Búsqueda en el NCBI BLAST de **gi|1781334**

**Nº acceso:** CAA71494

**Definición:** peroxidase [Spinacia oleracea]

**Fuente:** Spinacia oleracea

**Taxonomía:**

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Eudicotyledons; Core Eudicotyledons; Caryophyllales; Amaranthaceae; Spinacia.

**Referencia:** Diversity and conservation of plant peroxidises. Plant Peroxidase Newsletter 1, 4-7 (1993)