



Universidad
de Alcalá

Programa de Doctorado en

BIOLOGÍA EVOLUTIVA Y BIODIVERSIDAD (RD 778/1998)

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS
PEROXIDASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE
LIGNINAS EN MUTANTES DE *ARABIDOPSIS*

Tesis Doctoral presentada por

JOAQUÍN HERRERO MARTÍNEZ

Director:

DR. JOSÉ MIGUEL ZAPATA MARTÍNEZ

Alcalá de Henares, 2014

JOSÉ MIGUEL ZAPATA MARTÍNEZ, profesor titular de la Universidad de Alcalá,
y Director/codirector de la presente Tesis doctoral,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS PEROXIDASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE LIGNINAS EN MUTANTES DE *ARABIDOPSIS*”, ha sido realizado bajo su dirección por D. Joaquín Herrero Martínez dentro del Programa de Doctorado Biología Evolutiva y Biodiversidad (RD 778/1998), adscrito al Departamento de Ciencias de la Vida, de la Universidad de Alcalá. Esta tesis reúne todos los requisitos propios de este tipo de trabajo: rigor científico, aportaciones novedosas y aplicación de una metodología adecuada. Por lo tanto, doy mi Visto Bueno a la presentación de dicha Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, Mayo de 2014

José Miguel Zapata Martínez

GONZALO PÉREZ SUÁREZ, Director del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS PEROXIDASAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE LIGNINAS EN MUTANTES DE *ARABIDOPSIS*”, ha sido realizado por D. Joaquín Herrero Martínez dentro del Programa de Doctorado Biología Evolutiva y Biodiversidad (RD 778/1998), reúne todos los requisitos necesarios para su aprobación como Tesis doctoral, por acuerdo del Consejo de Departamento celebrado el día 27 de Mayo 2014

Alcalá de Henares, Mayo de 2014

Gonzalo Pérez Suárez

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Dpto. de Ciencias de la Vida de la Facultad de Biología de la Universidad de Alcalá con la ayuda de una beca del Programa Nacional de Formación de Personal Universitario del Ministerio de Educación (referencia de la ayuda: AP2009-0306), y ha sido financiado por el Ministerio de Educación (BFU2009-08151).

Una parte de los resultados han sido publicados en:

Artículos originales de investigación

Gómez Ros LV, Gabaldón C, López Nuñez-Flores MJ, Gutiérrez J, **Herrero J**, Zapata JM, Sottomayor M, Cuello J, Ros Barceló A. (2012). The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains *cis*-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide. *Planta* 236: 2, 327-342

Herrero J, Esteban-Carrasco A, Zapata JM (2013). Looking for *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 67, 77-86

Herrero J, Fernandez-Perez F, Yebra T, Novo-Uzal E, Pomar F, Pedreño MA, Cuello J, Guéra A, Esteban-Carrasco A, Zapata JM (2013) Bioinformatic and functional characterization of the basic peroxidase 72 from *Arabidopsis thaliana* involved in lignin biosynthesis. *Planta*. 237: 1599-1612

Novo-Uzal E, Fernandez-Perez F, **Herrero J**, Gutiérrez J, Gómez Ros LV, Bernal MA, Díaz J, Cuello J, Pomar F, Pedreño MA (2013) From *Zinnia* to *Arabidopsis*: approaching the involvement of peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*. 64: 3499-3518

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

Capítulos de libro

Herrero, J. (2010). En busca de homólogos de la peroxidasa básica de *Zinnia elegans* en *Arabidopsis thaliana*. Terceras Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. ISBN 978-84-8138-925-8.

Gasulla F, **Herrero J**, Esteban-Carrasco A, Ros-Barceló A, Barreno E, Zapata JM and Guéra A. (2011). Photosynthesis in lichen: light reactions and protective mechanisms. Advances in Photosynthesis- Fundamental Aspects. Intech. ISBN 978-953-307-928.

Congresos

Cuello J, **Herrero J**, Gómez Ros L, Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Ros Barceló A. 2010. Looking for *Arabidopsis thaliana* homologues to the *Zinnia elegans* basic peroxidase. XVIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). Valencia. Póster

Herrero J, Gómez Ros L, Esteban-Carrasco A, Zapata J.M, Ros Barceló A. 2010. Cis-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide in the promoter region of *Arabidopsis thaliana* peroxidase genes. Oxizymes & 9th International Symposium on Peroxidases. Leipzig (Alemania). Póster

López Núñez- Flores M.J, Gómez Ros L, **Herrero J**, Zapata J.M, Cuello J, Ros Barceló A. 2010. Architecture of the OCS element in the promoter of ZePrx, a gene codifying a peroxidase involved in lignifications. Plant Biology. Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Canadian Society of Plant Physiologists. Montreal (Canadá). Póster

Ros Barceló A, Gómez Ros L, **Herrero J**, Esteban Carrasco A, Zapata J.M. 2010. Minimal structural and regulatory elements contained in the promoter region which an *Arabidopsis thaliana* peroxidase involved in lignification must fulfil. Plant Biology. Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Canadian Society of Plant Physiologists. Montreal (Canadá). Póster

Gómez Ros L, Ros Barceló A, **Herrero J**, Esteban Carrasco A, Zapata J.M. 2011. Promoter region analysis of a putative *Arabidopsis thaliana* peroxidase involved in lignification. Cost Action FA 1006-Plant Metabolic Engineering For High Value Products. Murcia (España). Póster

Herrero J, Esteban Carrasco A, Zapata JM, Cuello J and Ros Barceló A. 2011. AC-elements in *Arabidopsis thaliana* peroxidase gene homologues of the *Zinnia elegans* basic peroxidase. XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Castellón de la Plana (España). Póster

Herrero J, Fernández-Pérez F, Cuello J, Pedreño MA, Pomar F, Zapata J.M, Esteban Carrasco A. 2012. Charge surface properties could determine the protein/cell wall interactions of *Arabidopsis thaliana* peroxidases (Atprxs) involved in lignin biosynthesis. 23rd International Conference on *Arabidopsis* Research (ICAR).Viena (Austria). Póster

Herrero J, Yebra T, Fernández-Pérez F, Esteban Carrasco A, Cuello J, Zapata J.M, Guéra A, Pedreño MA. 2012. Photosynthetic differences in *Arabidopsis knock out* mutants of two peroxidases probably involved in lignification. Plant Biology Congress Plant Biology Congress - jointly organized by FESPB and EPSO. Friburgo (Alemania). Póster

Fernández-Pérez F, **Herrero J**, Cuello J, Pomar F, Zapata JM, Pedreño MA, Novo-Uzal E. 2013. The suppression of *atprx52* affects fibers but not xylem lignification in *Arabidopsis*, by altering syringylunits proportion. XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal.Lisboa (Portugal). Póster

Herrero J, Yebra T, Fernández-Pérez F, Pedreño MA, Cuello J, Esteban Carrasco A, Guéra A, Zapata J.M. 2013. Bioinformatic and physiological characterization of an *Arabidopsis AtPrx72 knock-out* mutant for a peroxidase involved in lignification. XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal. Lisboa (Portugal). Comunicación oral.

Yebra T, **Herrero J**, Esteban-Carrasco A, Guéra A, Zapata JM. 2013. Physiological responses in *Arabidopsis peroxidase 52 knock-out* mutant plants. XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal. Lisboa (Portugal). Póster

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido y ayudado en la realización de esta Tesis doctoral.

En primer lugar al Dr. Alfonso Ros Barceló, artífice de este proyecto, gran científico y persona, quien me marcó el camino de la ciencia y lo más importante, me enseñó a pensar. En su memoria está dedicada esta Tesis.

En segundo lugar a mi director, Dr. José Miguel Zapata, que ha peleado por mí para que esta Tesis viese la luz, y para hacer de la ciencia mi profesión y modo de vida. Por la confianza depositada en mí, por su apoyo y amistad, por tranquilizarme en los momentos de agobio y preocupación, y por enseñarme a dar cada día la batalla de ganarse a uno mismo.

También de forma especial, quiero dar las gracias al Dr. Alfredo Guéra, una mente brillante, por sus tirones de orejas y sabios consejos a la hora de entender y aplicar la ciencia y por su inestimable ayuda en la elaboración de esta Tesis

Al Dr. Alberto Esteban, profesor, amigo y maestro, por su paciencia en mis inicios, por su amistad y por enseñarme gran parte de lo que he aprendido estos años.

A la Dra. M^a Ángeles Pedreño, que desde mis inicios me ha acogido con cariño y me ha ayudado a seguir adelante pese a las adversidades.

Al Dr. Juan Cuello, por su inestimable labor aportando el sentido común y la experiencia para allanar el camino de este proyecto.

A la Dra. Mariana Sottomayor, que me acogió y me ofreció todo su apoyo y ayuda para la realización de la Tesis. La estancia en su laboratorio fue una experiencia enriquecedora. A todas sus chicas, Raquel, Patricia, Sara, Inés y Juliana: *muito obrigado*.

A los doctores Leonardo Casano y Eva María del Campo, por sus consejos, compañerismo y ayuda en el día a día del laboratorio.

A la Dra. Fuencisla Merino y al Dr. Federico Pomar, que abrieron las puertas de su laboratorio y me acogieron como uno más del estupendo grupo que configuran. A Jorge, por su paciencia y ayuda; a Teresa por su aprecio, a Javier, a Cristina...a todos ellos, gracias.

A mis amigos y compañeros de trabajo Joaquín Barba, futuro gran doctor, de mente nerviosa y entusiasta, y Cristina Marco, “currante” y eficiente, por nuestros buenos ratos

de laboratorio y conversaciones, por su apoyo y amistad. Echaré de menos nuestros almuerzos de los viernes.

A mis compañeros de Murcia, Fran, Sarai, Lorena, Ana y Esther, por su amistad y porque han hecho que las estancias en Murcia sean recordadas con cariño.

A mis amigos, pilar fundamental en mi vida: Juanjo, Mari Jose, Isma, Raúl, Carlos, Carol, Lorena etc.

Y por último, a mi familia. Mis padres, que me dieron la vida y la suya, por los valores que me han inculcado y por su paciencia y apoyo, y a mis hermanos, con quienes comparto un mismo corazón. Sin ellos no habría sido posible esta Tesis.

*A mis abuelos, Félix y Jesús,
que pese a su reciente ausencia,
siguen en mi vida a través de su legado.*

“Aquí no te vamos a enseñar ciencia.

Aquí te vamos a enseñar a pensar”

Alfonso Ros Barceló.

Índice

Abreviaturas.....	1
I. Introducción.....	3
I.1 Ligninas	5
I.1.1 La lignificación y evolución de las plantas	6
I.1.2. Naturaleza, composición y localización.....	7
I.1.3 Biosíntesis de ligninas.....	10
I.1.4 Importancia de la lignificación.....	14
I.2 Peroxidasas	15
I.2.1 Polimorfismo.....	17
I.2.2 Naturaleza y estructura.....	19
I.2.3 Ciclo catalítico	22
I.2.4 Función y localización	23
I.2.5 Especificidad de sustrato.....	25
I.2.6 Papel fisiológico en la lignificación.....	30
I.2.7. La peroxidasa básica de <i>Zinnia elegans</i>	31
I.3 <i>Zinnia elegans</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> como plantas modelo en lignificación.....	34
I.4 La lignificación como sumidero de carbono de la fotosíntesis	38
I.5 Métodos de estudio de la fotosíntesis en plantas.....	39
I.5.1 Estudio de las curvas de inducción de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> mediante el test JIP.....	40
I.5.2 Estudio de la capacidad de fotosíntesis mediante el analizador de gases en el infrarrojo (IRGA)	43
II. Objetivos.....	47
III. Capítulo I: Análisis bioinformático de las peroxidasas de <i>Arabidopsis thaliana</i> implicadas en procesos de lignificación	51
III.1 Materiales y Métodos.....	53
III.1.1 Localización de las peroxidasas de <i>A. thaliana</i> (AtPrx) homólogas a ZePrx en las bases de datos	55
III.1.2 Construcción del árbol filogenético.....	55
III.1.3 Análisis de homología de secuencias y modelado molecular de las AtPrxs	55

III.1.4 Análisis de la secuencia de los mRNAs	56
III.1.5 Análisis de los promotores de las AtPrxs	56
III.2 Resultados y Discusión	59
III.2.1 Análisis BLAST y árbol filogenético	61
III.2.2 Elementos estructurales que debe contener una peroxidasa implicada en procesos de lignificación	64
III.2.3. Interacciones proteína/pared celular y localización final (compartimentación)	72
III.2.4. mRNA, transcritos de AtPrx	76
III.2.5. Regulación hormonal de las AtPrxs homólogas a ZePrx a partir del análisis in silico de la región promotora	83
IV. Capítulo II: Análisis funcional de las peroxidasas 52 y 72 de <i>A. thaliana</i>, implicadas en procesos de lignificación	109
IV.1 Materiales y Métodos	111
IV.1.2 Material Vegetal	112
IV.1.3 Cultivo <i>in vitro</i> , crecimiento y selección de mutantes	113
IV.1.4 Análisis fenotípico	114
IV.1.5 Aislamiento de DNA y amplificación	114
IV.1.6 Medida de los niveles de expresión génica mediante <i>Real Time</i> RT-PCR (Q-PCR)	115
IV.1.7 Extracción y determinación de la cantidad de proteínas	117
IV.1.8 Determinación de la actividad peroxidasa	117
IV.1.9 Extracción y cuantificación de fenoles	117
IV.1.10 Extracción y cuantificación de azúcares solubles	118
IV.1.11 Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos	118
IV.1.12 Estudio de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> . Test JIP	120
IV.1.13 Estudio de la fotosíntesis mediante el empleo de un sistema analizador de gases en el infrarrojo (IRGA)	125
IV.1.14 Tratamientos de inducción de estrés fotooxidativo	127
IV.1.15 Análisis estadístico	128
IV.2 Resultados	129

IV.2.1 Selección de mutantes de <i>A. thaliana</i> noqueados en los genes de peroxidasa 52 y 72.....	131
IV.2.2 Análisis de los niveles de expresión del gen de peroxidasa en los mutantes homocigóticos mediante el empleo de RT-PCR en tiempo real (<i>Real Time</i> RT-PCR o Q-PCR).....	137
IV.2.3 Caracterización biométrica de los mutantes <i>atprx52</i> y <i>atprx72</i> de <i>Arabidopsis</i> versus la variedad silvestre.....	141
IV.2.4 Estudio de la actividad peroxidasa, contenido de fenoles totales y azúcares solubles en los mutantes <i>atprx52</i> y <i>atprx72</i> de <i>Arabidopsis</i>	145
IV.2.5 Caracterización de los fenotipos de los mutantes <i>atprx52</i> y <i>atprx72</i> de <i>Arabidopsis</i> en cuanto a su capacidad de fotosíntesis	148
IV.3 Discusión	169
V. Conclusiones Generales.....	183
VI. Bibliografía.....	185
Anexos.....	221

Abreviaturas

1FHF: peroxidasa de semilla de soja.

1PA2: peroxidasa 53 de *Arabidopsis thaliana*.

1SCH: peroxidasa de cacahuete.

AREs: regiones ricas en adenina y uracilo (AU)

ARFs: factores de respuesta a auxinas

AtPrx: peroxidasa de *Arabidopsis thaliana*

AuxREs: elementos cis de respuesta a auxinas

BZR1: BR-responsive brassinazole-resistant 1

BES1: BR-responsive bri1-EMA-supresor1

Chl: Clorofila

DST: downstream sequence (secuencia aguas abajo)

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetracético (ethylene diamine tetraacetic acid)

G: guaiacilo

H: *p*-hidroxifenilo

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

NO: Óxido nítrico

NT: nucleótido

ORF: Open reading frame (marco abierto de lectura)

PAR: radiación fotosintéticamente activa

PB: pares de bases

PEP: fosfoenol piruvato

PQ: plastoquinona

PVP: Polivinilpolipirrolidona

RC: Centro de Reacción

RE: Retículo Endoplasmático

S: siringilo

SAUR: Small auxin-up RNA

TFs: factores de transcripción.

UTR: regions no traducidas.

ZePrx, peroxidasa básica de *Zinnia elegans*

I. Introducción

I.1 Ligninas

El xilema constituye la mayor ruta para el transporte de agua en las plantas vasculares. Es una ruta sencilla, de baja resistencia que permite el transporte del agua en grandes cantidades y con gran eficacia principalmente desde la raíz hasta las hojas (Kozela y Regan 2003). El xilema está compuesto por células no conductoras, parénquima y fibras, y por células conductoras, o elementos traqueales (vasos y traqueidas), que son esenciales para el transporte. La formación del xilema ha sido objeto de numerosos estudios de diferenciación en plantas superiores, no solo porque su función es esencial para la existencia de las plantas vasculares, sino también porque la formación del xilema está considerada como uno de los procesos de diferenciación más distintivos que ocurren en las plantas terrestres (Novo-Uzal *et al.*, 2013). La mayoría de las células diferenciadas realizan sus funciones especializadas hasta su muerte, pero en el caso del xilema, su función no comienza hasta después de la muerte celular (Roberts y McCann, 2000). Por lo tanto, las células funcionales conductoras de agua no poseen membranas ni orgánulos, y las gruesas paredes celulares lignificadas que quedan forman tubos a través de los cuales el agua fluye con relativa poca resistencia (Kozela y Regan, 2003). Estas células conductoras del agua están internamente recubiertas con ligninas, las cuales confieren resistencia frente a las fuerzas de tracción de las columnas de agua, proporcionan soporte estructural y resistencia frente a la flexión a los órganos aéreos, y proporcionan impermeabilidad. Las ligninas pueden también proporcionar protección frente a la degradación de la pared celular por el ataque de microorganismos (Espíñeira *et al.*, 2011). En este contexto, la lignificación de la pared celular es uno de los principales factores restrictivos en el uso y reciclado de la biomasa vegetal (Anterola y Lewis, 2002).

Las ligninas se encuentran específicamente en las plantas vasculares (Tracheophyta) (Ros Barceló, 1997), y se producen selectivamente en la pared celular secundaria de los vasos del xilema y traqueidas, pero también en las fibras y esclereidas. Las ligninas han sido identificadas en las Pteridophytas (helechos, lycophytas y colas de caballo), las primeras plantas vasculares, y probablemente jugaron un papel clave en la colonización del ambiente terrestre por las plantas durante la transición del Ordovícico-Silúrico hace 400-450 millones de años (Ros Barceló, 1997).

El control espacial y temporal de la biosíntesis de ligninas es extremadamente importante debido a que la lignificación es un proceso metabólicamente costoso que requiere de grandes cantidades de esqueletos carbonados y equivalentes de reducción (Amthor, 2003). Las plantas no poseen ningún mecanismo para degradar ligninas (Lewis y Yamamoto, 1990), por lo que todo carbono invertido en la biosíntesis de ligninas no es recuperable. Por tanto, las células lignificadas representan un sumidero de carbono significativo, y por ello, las plantas deben regular cuidadosamente la síntesis de polímeros de lignina frente a la disponibilidad de recursos.

I.1.1 La lignificación y evolución de las plantas

Los primeros datos del registro fósil sugieren que las primeras plantas terrestres datan de hace unos 400-450 millones de años, durante la transición del Ordovício-Silúrico. Las primeras plantas en colonizar el ambiente terrestre se vieron inmediatamente expuestas a una serie de nuevos estreses que no tenían en el medio acuático: la exposición a la radiación ultravioleta, la carencia de un soporte estructural, el estrés por desecación y ocasionalmente el ataque de herbívoros y patógenos coetáneos (Weng y Chapple, 2010). Para luchar frente a estos nuevos estreses las primeras plantas terrestres desarrollaron una serie de rutas metabólicas, a menudo referidas al metabolismo secundario, entre las cuales el metabolismo fenilpropanoide tuvo un papel crucial pues permitió la acumulación de fenilpropanoides simples cuyo máximo de absorción se encuentra en la región del ultravioleta (280-320 nm).

A pesar de la adquisición de este metabolismo fenilpropanoide, su tamaño permanecía reducido debido a la ausencia de un soporte mecánico (Bateman *et al.*, 1998). No fue hasta la adquisición de la habilidad de depositar lignina, compuesto de naturaleza fenilpropanoide, cuando las plantas comenzaron su dominio del ecosistema terrestre (Weng y Chapple, 2010), permitiendo mantenerse erguidas, desenvolverse en la tercera dimensión y desarrollar un sistema vascular de transporte de agua y nutrientes que les permitió expandirse en tamaño. Pero no solo eso, sino que las ligninas conferían a las primeras plantas terrestres un mecanismo de defensa frente a los patógenos y herbívoros que pronto co-evolucionarían con las plantas vasculares.

De esta forma la lignificación transformó la ruta fenilpropanoide en el mayor sumidero de carbono en las plantas, por detrás de la celulosa, llegando a suponer casi el 30% de la biomasa terrestre (Boerjan *et al.*, 2003; Ros Barceló *et al.*, 2007).

Las consecuencias de la lignificación pronto tuvieron efecto, pues el desarrollo de los primeros traqueófitos tanto en abundancia como en diversidad permitió el desarrollo de casi todas las formas de vida terrestres, desde los artrópodos, hasta los hongos y microorganismos. Además, aceleró la formación del suelo mediante la mineralización de las rocas y la acumulación de materia orgánica. Debido a que la lignina es un compuesto difícil de degradar, esto supuso una acumulación de grandes cantidades de carbono con la consiguiente disminución del CO₂ atmosférico y el incremento de los niveles de O₂ durante la era del Paleozoico tardío (Berner, 1993; Berner *et al.*, 2000). Estos cambios en la composición atmosférica propiciaron la evolución de los insectos voladores (Dudley, 1998) y la aparición de los megáfitos u hojas verdaderas de los árboles (Beerling *et al.*, 2001) tal y como hoy las conocemos.

I.1.2. Naturaleza, composición y localización

Las ligninas son heteropolímeros amorfos tridimensionales que resultan del acoplamiento oxidativo de tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos: *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, en una reacción mediada por lacasas (Berthet *et al.*, 2011; Turlapati *et al.*, 2011) y, principalmente, peroxidasas vegetales de clase III (Ros Barceló, 1997). Esta reacción de entrecruzamiento produce un heteropolímero hidrofóbico e inactivo ópticamente (Ralph *et al.*, 2004) compuesto de unidades *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G), y siringilo (S), respectivamente (figura I.1). Las ligninas son por tanto heteropolímeros fenólicos mal definidos cuya composición monomérica varía ampliamente y las cuales están asociadas covalentemente con ciertos polisacáridos, probablemente de naturaleza péptica (Cathala *et al.*, 2001), en la pared celular vegetal.

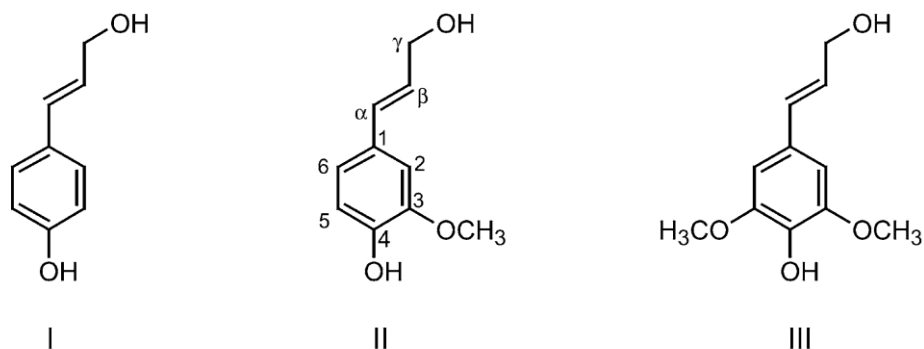


Figura I.1. Estructuras de los alcoholes *p*-cumarílico (I), coniferílico (II) y sinapílico (III). Tomado de Ros Barceló *et al.* (2004).

Por lo general (figura I.2), las ligninas de las angiospermas se componen de unidades H, G y S, mientras que en las gimnospermas las ligninas carecen de unidades S, y se componen principalmente de unidades G, con una proporción menor de unidades H, aunque hay algunas excepciones (figura I.2) (Novo-Uzal *et al.*, 2009). Los helechos suelen presentar el mismo patrón que las gimnospermas, a pesar de que la presencia de unidades S se ha descrito anteriormente en algunas especies, especialmente en *Selaginela martensii*, que contiene un 70% de unidades S (Gómez Ros *et al.*, 2007a; Espiñeira *et al.*, 2011). La presencia de este tipo de unidades en plantas tan alejadas evolutivamente indican un tipo de evolución convergente en la biosíntesis de ligninas S (Li y Chapple, 2010).

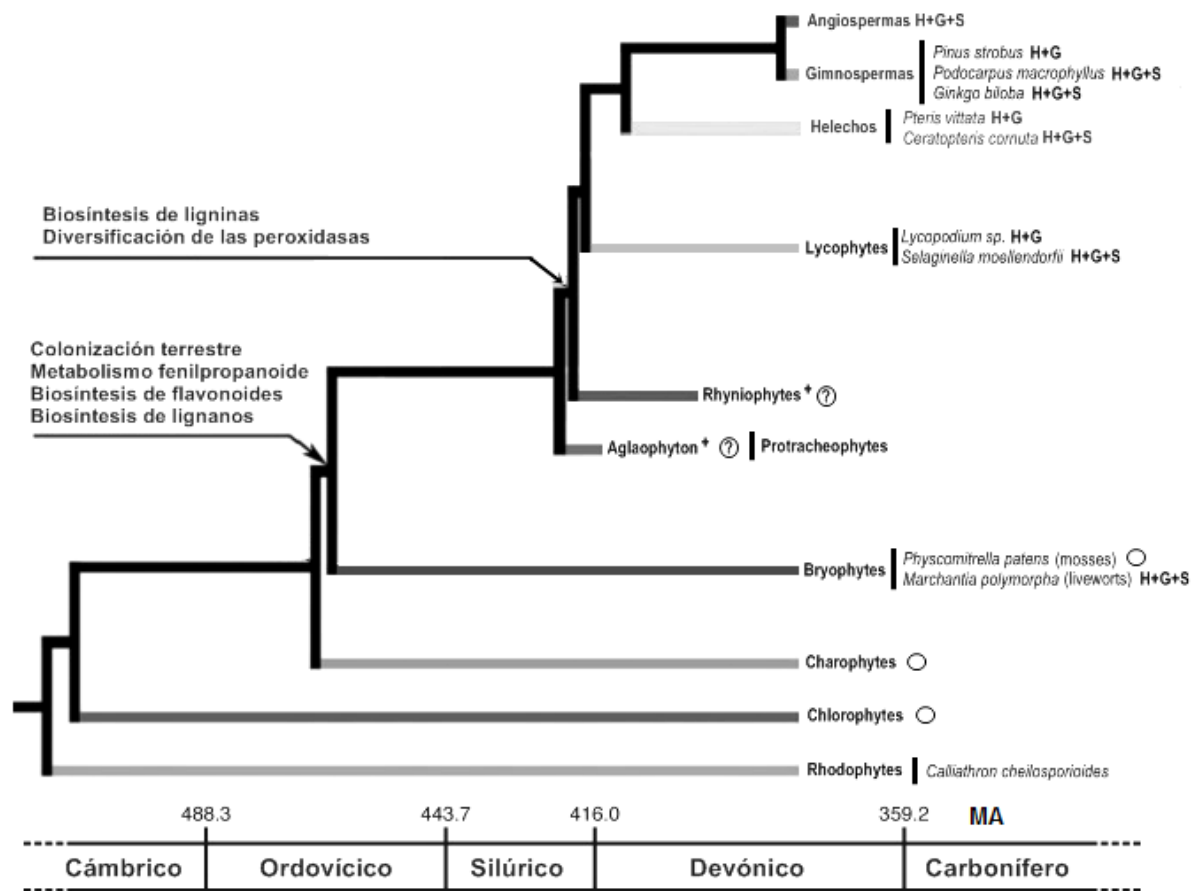


Figura I.2. Árbol filogenético de plantas marcado con los principales hitos de la evolución de la biosíntesis de ligninas. Se muestra la distribución de la lignina y su composición monomérica en los principales linajes de plantas. Círculo abierto, sin lignina; círculo con signo de interrogación, desconocido. + Linaje extinto. H, monómeros p-hidroxifenilo, G, monómeros guaiacilo y S, monómeros siringilo. Adaptado de Weng y Chapple (2010).

Los briófitos no sintetizan lignina, pero se ha visto que acumulan fenilpropanoides solubles como lignanos y flavonoides (Weng y Chapple, 2010). Más aún, el genoma del musgo de referencia *Physcomitrella patens* contiene ortólogos de las 8 principales enzimas de la biosíntesis de ligninas necesarias para la síntesis de los alcoholes *p*-cumarílico y coniferílico, mientras que el alga verde de referencia, *Chlamydomonas reinhardtii* no contiene ninguno (Weng *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009). Sin embargo, recientemente se ha descrito la presencia de lignina en la hepática *Marchantia polymorpha* y más sorprendentemente en el alga roja *Callithron cheilosporioides*. Estos resultados sugieren que los primeros indicios del metabolismo de biosíntesis de monolignoles evolucionaron antes de la aparición de los primeros traqueófitos y que en ciertos linajes se ha perdido, como en las algas verdes y musgos.

En cuanto a su localización, las ligninas se encuentran mayoritariamente en las paredes de determinados tipos celulares como son las traqueidas, los vasos, las fibras del xilema y del floema y las esclereidas (Ros Barceló, 1997). 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 *et al.*, 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).

I.1.3 Biosíntesis de ligninas

Aunque algunas de las etapas básicas de la lignificación fueron parcialmente estudiadas hacia la década de los 50, los resultados inmediatos de las investigaciones

llevadas a cabo en los últimos años han puesto de manifiesto la gran complejidad de la ruta de biosíntesis de las ligninas. De hecho, los conocimientos que se tienen actualmente sobre dicho proceso son fragmentarios y han sido obtenidos del estudio concreto de ciertos pasos específicos en diversas especies y tejidos vegetales.

La biosíntesis de las ligninas (figura I.3) se desarrolla a través de una larga secuencia de reacciones que implican tres rutas: La ruta del sikimato (i) la ruta común fenilpropanoide (ii) y la ruta específica de la biosíntesis de ligninas (iii).

- 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 (C3'H), la hidroxicinamoil CoA hidroxicinamoil-CoA sikimato/quinato hidroxicinamoiltransferasa (HCT) y las O-metil-transferasas (OMT) dependientes de *S*-adenosil-*L*-metionina, tales como la cafeoil-CoA-O-metiltransferasa (CCoAOMT, EC 2.1.1.104) y la *p*-hidroxicinamato CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12). Los productos finales de esta ruta, los esteres 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), la ferulato-5-hidroxilasa (F5H) y la O-metil-transferasa dependiente de *S*-adenosil-*L*-metionina (COMT) (Osakabe *et al.*, 1999; Franke *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000).

El último paso en el proceso de la biosíntesis de las ligninas es la oxidación de los alcoholes 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.

De esta forma, 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.

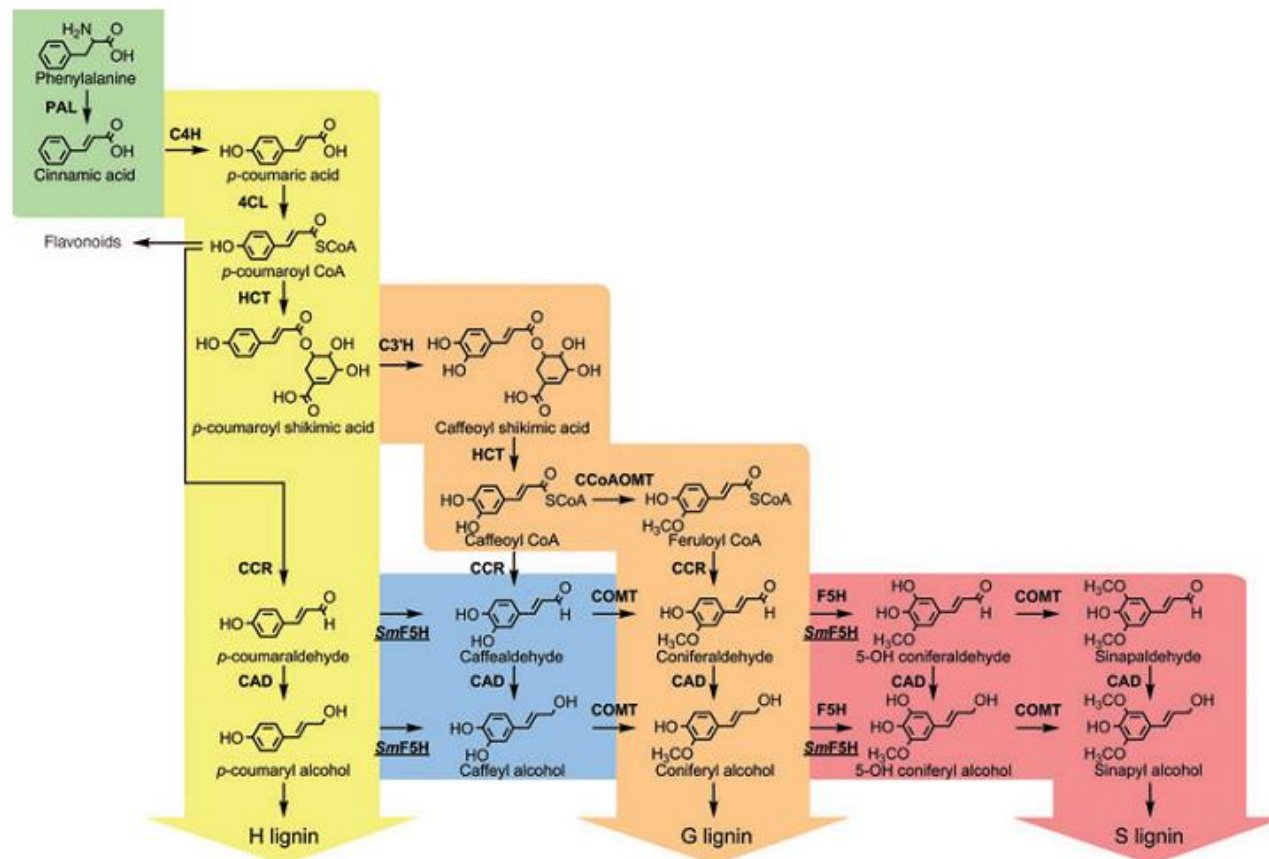


Figura I.3. Ruta de biosíntesis de monolignoles. La ruta que conduce a la biosíntesis de ligninas de tipo S está coloreada de rojo y es típica de angiospermas y del licófito *Selaginella moendorffii*. Otros pasos típicos de *Selaginella* que no están presentes en angiospermas están coloreados en azul. CAD, (hidroxi)cinamil alcohol dehidrogenasa; CCoAOMT, cafeoil-CoA O-metil transferasa; CCR, cinamoil-CoA reductasa; C3'H, *p*-coumaroil sikimato 3'-hidroxilasa; C4H, cinamato-4-hidroxilasa; 4CL, 4 hidroxicinamoil-CoA ligasa; COMT, ácido cafeico O-metiltransferasa; F5H, Ferulato 5-hidroxilasa; SmF5H, Ferulato 5-hidroxilasa bifuncional de *S. moendorffii*; HCT, hidroxicinamoil-CoA sikimato/quinato hidroxicinamoiltransferasa; PAL, fenilalanina amonioliada. Tomado de Weng y Chapple, 2010.

I.1.4 Importancia de la lignificación

La lignina es el compuesto más abundante en la corteza terrestre después de la celulosa llegando a constituir entre el 25-30% de la biomasa terrestre (Boerjan *et al.*, 2003; Ros Barceló *et al.*, 2007). La adquisición de la capacidad de lignificación marcó un antes y un después durante la evolución de las plantas. Así, al permitirles la colonización del medio terrestre, las plantas quedaron directamente expuestas a toda una variedad de estreses ambientales (tanto bióticos como abióticos) que previamente no habían experimentado en su nicho ancestral primitivo, el medio acuático. Toda esa serie de estreses han sido aparentemente la fuerza motriz de la evolución vegetal (Ros Barceló, 1997; Ros Barceló *et al.*, 2004, 2007) que, en última instancia, ha derivado en la diversificación de las especies terrestres. Actualmente se han descrito más de 260.000 especies de plantas vasculares terrestres (que lignifican) frente a las 26.000 especies de plantas terrestres no vasculares y las, aproximadamente, 30.000 especies de plantas acuáticas no vasculares (que no lignifican) (figura I.4).

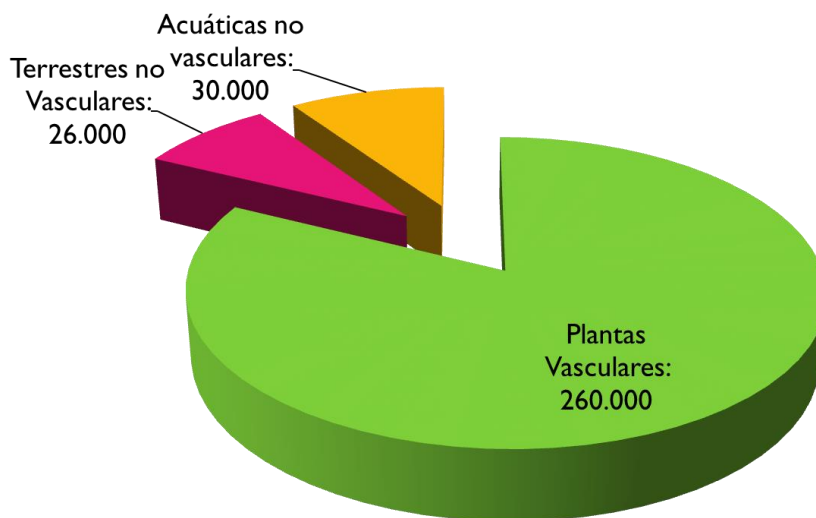


Figura I.4. Representación gráfica de la diversidad de especies de plantas vasculares (que lignifican) y no vasculares (que no lignifican).

Las ligninas presentan también una gran importancia desde un punto de vista económico puesto que la lignificación de las plantas puede restringir su utilización y

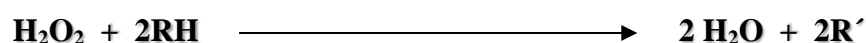
aprovechamiento por el hombre. Así, la intensa lignificación que experimenta la madera dificulta y encarece las labores de la industria papelera, aumentando adicionalmente el nivel de los residuos tóxicos indeseables (Ros Barceló *et al.*, 2004). Sobre la importancia de este fenómeno basta decir que la industria papelera europea es la responsable del 27 % de los residuos tóxicos vertidos a los ríos y al mar. Así, estas industrias llegan a degradar 25 millones de m³ de agua, vertiendo 0.5 millones de toneladas de organoclorados, junto con 10.000 toneladas de partículas sólidas, 15.000 toneladas de SO₂ y 3.500 toneladas de NO_x durante la producción de 1 millón de toneladas de pasta de papel, y similares, y que supone un gasto energético de casi 1 millón de megavatios-hora, equivalentes a 20.000 toneladas de carbón.

La lignificación también disminuye la calidad nutritiva de las plantas usadas como forrajes y pastos al reducir su digestibilidad y, por lo tanto, su utilidad como alimentos (Jung y Ni, 1998). La lignificación es, finalmente, un factor indeseable durante el procesamiento por las industrias agroalimentarias de ciertas hortalizas, como los espárragos y las alcachofas, al conferir una dureza indeseable a los productos de partida.

De ahí la importancia de estudiar sus mecanismos síntesis y degradación, objeto de este trabajo de investigación.

I.2 Peroxidasas

Las peroxidasas (H₂O₂: donador de hidrógeno: H₂O₂ oxidorreductasas) son proteínas que tienen un grupo porfirínico y un metal (catión hierro) como grupo prostético y que catalizan la oxidación de una gran variedad de sustratos a expensas de H₂O₂ en dos pasos consecutivos de un solo electrón (Zapata *et al.*, 1998; Esteban-Carrasco, 2005; Ros Barceló *et al.*, 2007; Peroxibase, 2014).



En el proceso de lignificación, las peroxidasas catalizan la oxidación de los tres alcoholes (*p*-coumarílico, conerfílico y sinapílico) produciendo radicales fenoxi y agua (Ros Barceló, 1997; Ros Barceló *et al.*, 2004).

Las peroxidasas son enzimas ubicuas en la naturaleza y las podemos encontrar en todos los seres vivos, lo que ha hecho que se clasifiquen en base a sus distintas propiedades estructurales y catalíticas (Welinder, 1992).

Las peroxidasas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, habiéndose encontrado en Euglenofitas (Shigeoka *et al.*, 1980), Rodofitas (Collen *et al.*, 1994), Clorofitas (Vanden Driessche *et al.*, 1984, Weger, 1997), Briofitas (Matlok *et al.*, 1989), Pteridofitas (Bakardjieva *et al.*, 1996), y en todas las Espermatofitas estudiadas (Siegel, 1993).

Las peroxidasas se clasifican en dos grandes superfamilias, una que incluye a las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas, y otra superfamilia no relacionada estructuralmente con la anterior constituida por las peroxidasas animales (Welinder 1992, Hiraga *et al.*, 2001). A su vez, dentro de la superfamilia de las peroxidasas vegetales, fúngicas y bacterianas se han definido tres clases en base a sus diferencias en la secuencia de aminoácidos (figura I.5) (Welinder, 1992):

Superfamilia	Clase	Miembro (número EC)	Origen	Peso molecular (kDa)
Peroxidasas de plantas		Citocromo c peroxidasa (EC 1.11.1.5)	Levaduras y bacterias	32-63
	I	Catalasa-peroxidasa (EC 1.11.1.6)	Bacterias y hongos	150-240
		Ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11)	Plantas	30-58
		Manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13)	Hongos	43-49
	II	Ligninasa (EC 1.11.1.14)	Hongos	40-43
	III	Peroxidasa (EC 1.11.17, POX)	Plantas	28-60

Figura I.5. Clasificación de la superfamilia de peroxidasas vegetales. Modificado de Hiraga *et al.* (2001)

- Clase I: incluye las enzimas intracelulares de plantas, bacterias y levaduras tales como la citocromo c peroxidasa mitocondrial de bacterias y levaduras, la catalasa-peroxidasa de bacterias, la ascorbato peroxidasa cloroplástica y citosólica de células vegetales y las peroxidasas bacterianas (Jespersen *et al.*, 1997). No poseen naturaleza glicoprotéica, 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 muy termolábiles.

- Clase II: agrupa a todas las peroxidasas fúngicas de secreción (ligninaperoxidasas (LiP), manganeso-peroxidasas (MnP) y peroxidasas fúngicas de secreción) (Eisenstadt y Bogolitsyn, 2010).
- Clase III: contiene todas las peroxidasas vegetales de secreción y muestran características distintas a otras peroxidasas vegetales. Son de naturaleza glicoprotéica, 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.

Una peroxidasa de Clase III “modelo” es la peroxidasa de rábano (*Armoracia rusticana*), ampliamente estudiada y empleada debido a que se encuentra en grandes cantidades en las raíces del rábano; la peroxidasa de semilla de soja 1FHF de fácil obtención, y por último, otra peroxidasa muy estudiada y más cercana a nuestro estudio sobre la lignificación, la peroxidasa 53 de *Arabidopsis*, también llamada 1PA2 (*Arabidopsis thaliana* peroxidase A2) (Østergaard *et al.*, 2000) que como veremos más adelante es descartada como peroxidasa implicada en la biosíntesis de ligninas debido, entre otras cosas, a su naturaleza ácida (Herrero *et al.*, 2013a).

Últimamente, se han descrito unas nuevas peroxidasas, las tioredoxinas peroxidasas, las cuales carecen de un grupo porfirínico (Rhee *et al.*, 2001) y caracterizadas por poseer un centro activo muy conservado, Cys-Gly-Pro-Cys capaz de reducir puentes disulfuro de proteínas.

1.2.1 Polimorfismo

Las peroxidasas presentan un alto grado de polimorfismo, el cual puede ser estudiado mediante isoelectroenfoque. De acuerdo con su punto isoeléctrico, las isoenzimas de peroxidasa pueden ser clasificadas en ácidas ($pI < 7,0$), moderadamente básicas ($7,0 < pI < 9,0$) o fuertemente básicas ($pI > 9,0$), mostrando una diferente

localización subcelular pero una especificidad de sustrato similar. Este grado de polimorfismo viene dado porque las peroxidasas vegetales están codificadas en familias multigénicas. 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 traduccionales (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 *et al.*, 1987). Estas interacciones también pueden modificar sus propiedades catalíticas (Ros Barceló y Muñoz, 1989), ampliando así su papel metabólico. En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado 73 genes (Tognolli *et al.*, 2002) que se han utilizado para establecer las diferentes relaciones evolutivas de las peroxidasas en el reino vegetal (Duroux y Welinder, 2003). Estos 73 genes se han agrupado en grupos similares y se han hecho estudios comparativos en dicotiledóneas, monocotiledóneas y otros grupos principales de plantas terrestres y algas, estableciendo que las peroxidasas de la clase III aparecieron en el momento en el que las plantas colonizaron la tierra.

Por último, en arroz (*Oryza sativa*) existen hasta 138 genes que codifican peroxidasas (Passardi *et al.*, 2004). Esta gran variedad se debe a procesos de duplicación y recombinación de genes.

Debido a las investigaciones de secuenciación de genes, unidas a los experimentos de micro y macroarrays (Valério *et al.*, 2004), en los que se estudia el patrón de expresión de los genes y su función, se pueden realizar estudios filogenéticos para poder encontrar el ancestro de las peroxidasas y poder entender la “especialización” de cada isoenzima de peroxidasa.

Todo indica que la variación en la estructura molecular de las peroxidasas ha estado más relacionada con la función que van a realizar que con la especie a la que pertenecen. Es decir, durante la evolución, las isoformas de peroxidasa han conservado una porción importante de su estructura al participar en funciones similares o han podido divergir para llevar a cabo diferentes funciones (Carusso *et al.*, 2001).

I.2.2 Naturaleza y estructura

Las peroxidasas vegetales de Clase III (EC.1.11.1.7) son glicoproteínas monoméricas con un tamaño comprendido entre 28 y 60 KDa que se localizan en vacuolas y pared celular (Ros Barceló *et al.*, 2007). Contienen como grupo prostético una molécula de protohemina IX (hemo b), dos iones estabilizadores Ca^{+2} y en su estado nativo, el átomo de hierro se encuentra en el estado de oxidación +3 [Fe (III)]. Este hierro está pentacoordinado con los cuatro átomos de nitrógeno de la estructura tetrapirrólica del grupo hemo, y con un átomo de nitrógeno de un residuo de histidina proximal. La sexta posición de coordinación se encuentra libre determinando así el estado de alto espín para el hierro (Banci, 1997). El grupo prostético resulta esencial para la actividad enzimática ya que su eliminación provoca la total inactivación de la enzima (Chibbar *et al.*, 1984; Ros Barceló *et al.*, 2007) (figura I.6).

Estudios cristalográficos demuestran que la estructura de las peroxidasas consiste en 13 α -hélices, de las cuales 10 están presentes en peroxidasas de procariotas (Welinder, 1992; Passardi *et al.*, 2004). Las tres secuencias de las hélices B, D y F están muy conservadas, y el N-Terminal, incluyendo la hélice A, y el bucle F-G son las menos conservadas. En el interior de estas hélices se encierra el grupo hemo no unido covalentemente (Gajhede *et al.*, 1997) (figura I.6).

Las distintas peroxidasas difieren en su estructura primaria y en la especificidad de sustratos. Sin embargo, los motivos estructurales y los centros catalíticos son muy similares entre ellos (Gazarian *et al.*, 1996).

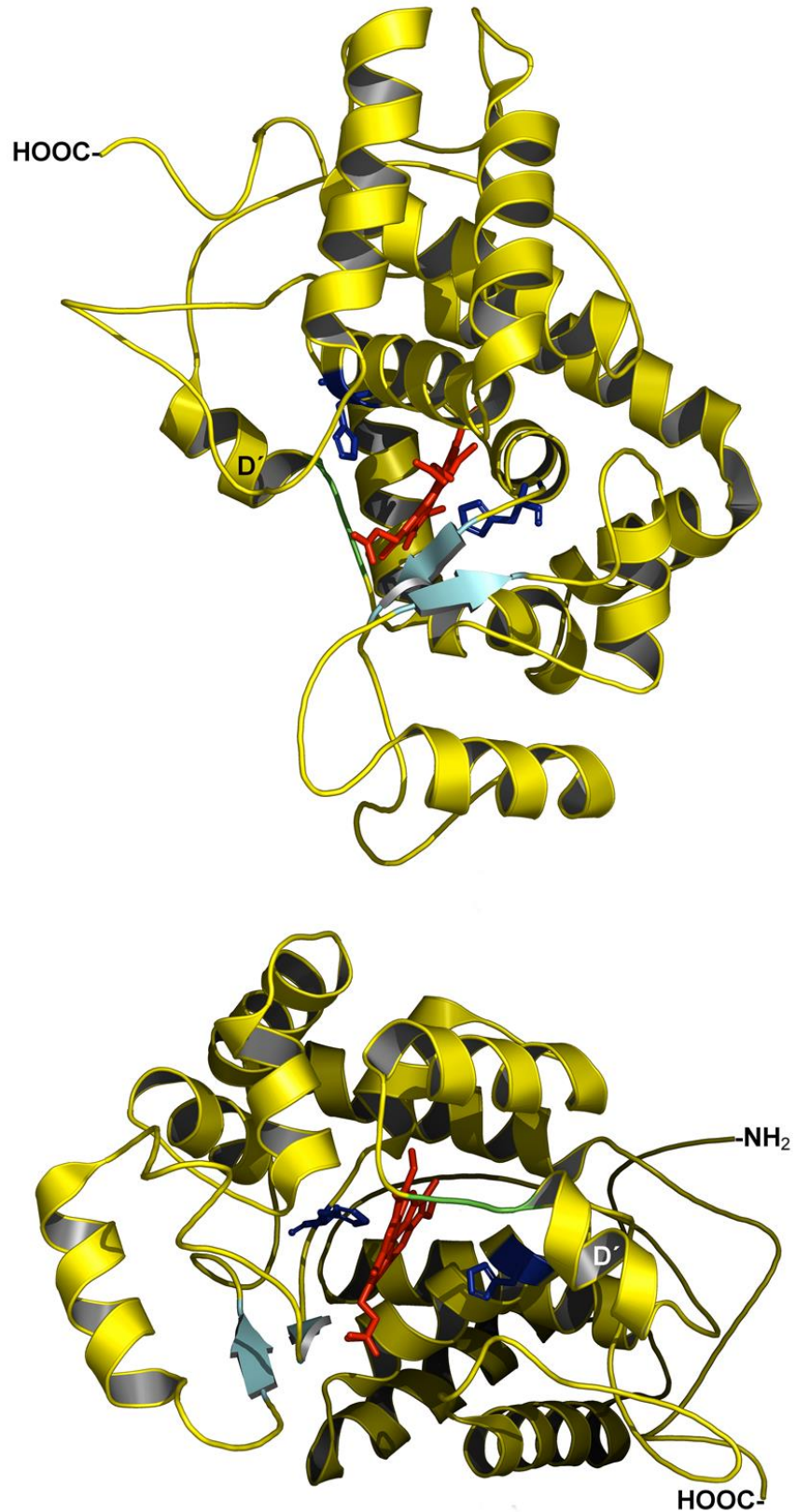


Figura I.6. Estructura 3D de la peroxidasa 1PA2 (*Arabidopsis thaliana* peroxidase A2) (Østergaard *et al.*, 2000). Se pueden observar las α -hélices conservadas: A, B, C, D, E, F, F', H, I, y J. Las láminas β están coloreadas de azul pálido. El grupo prostético hemo está coloreado de rojo y las histidinas proximal y distal están coloreadas de azul. Modificado de Ros Barceló *et al.* (2007).

En la figura I.7 se muestra un esquema de las características estructurales de las peroxididasas de clase III. En el extremo N-Terminal existe un péptido señal que sirve para dirigir la proteína a un compartimento celular en donde lleva a cabo su función. Los cuadros marcados en negro, representan tres dominios conservados: el I y el III pertenecen a los dominios de unión con el grupo hemo, y un dominio central conservado -dominio II- con función desconocida. También existe una región, marcada con rayas, relacionadas con la función específica, las cual es variable en longitud y secuencia entre las diferentes peroxididasas y forma parte del canal de acceso del substrato en rábano y cacahuete (Schuller *et al.*, 1996; Gajhede *et al.*, 1997) y que forma parte de las cadenas de las hélices F. Las histidina distal y proximal, que participan en la catálisis enzimática, y 8 cisteínas, que forman puentes disulfuro, y que intervienen en el mantenimiento de la estructura de la enzima, son características invariables de todas las peroxididasas de clase III.

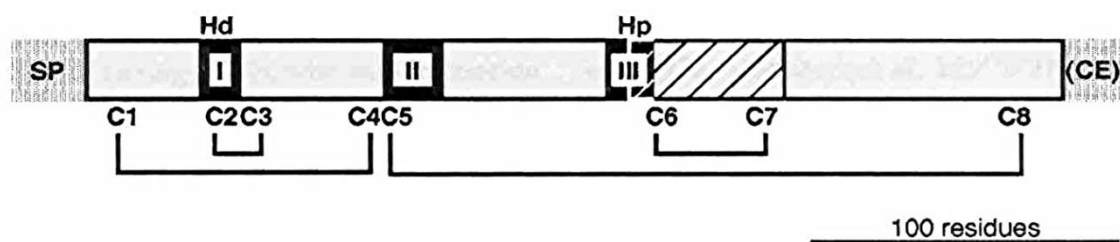


Figura I.7: Características estructurales de una peroxididasa. Las características de una peroxididasa típica, HRP C, representada esquemáticamente según la secuencia y la estructura tridimensional. Tomado parcialmente de Hiraga *et al.* (2001). También se muestran algunas secuencias conservadas en muchas peroxididasas (Passardi *et al.*, 2004). Los dominios de las cisteínas 2-3 y 6 son necesarios para la interacción del grupo hemo con las histidinas. Las líneas entre las cisteínas indican los puentes disulfuro que se forman entre ellas. SP-Péptido Señal, CE-Extremo C-terminal.

Los genes de peroxididasa secuenciados hasta ahora, tienen un péptido señal del retículo endoplásmico y algunas también poseen un propéptido carboxiterminal que puede dirigir las hacia las vacuolas (Neuhaus, 1996).

También se han encontrado actividades peroxididasa en cloroplastos (Zapata *et al.*, 1998) y en mitocondrias que requerirían de otros péptidos señales específicos (Šukalović y Vuletic, 2003).

I.2.3 Ciclo catalítico

Las peroxidasas de clase III catalizan la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos a expensas de H_2O_2 en dos pasos consecutivos de un solo electrón, y su ciclo catalítico puede ser descrito como sigue (figura I.8): H_2O_2 oxida la forma férrica de la enzima (FeIII) en una oxidación de dos electrones para dar lugar al compuesto I intermediario de la enzima ($\text{FeIII} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{compuesto I} + \text{H}_2\text{O}$). El compuesto I acepta un electrón del anión fenolato (R^-) para dar al correspondiente radical libre (R^\bullet) y al intermediario hemo oxiferrilo conocido como compuesto II ($\text{compuesto I} + \text{R}^- \rightarrow \text{compuesto II} + \text{R}^\bullet$). La subsiguiente reducción de un electrón del compuesto II por una segunda molécula de fenolato da lugar a la forma férrica de la peroxidasa, FeIII ($\text{compuesto II} + \text{R}^- \rightarrow \text{FeIII} + \text{R}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$), cerrando así el ciclo catalítico de la enzima. Tanto la modificación de los Ca^{2+} como la modificación de los glicanos podría afectar a la tasa de reacción de la enzima (Ros Barceló *et al.*, 2007).

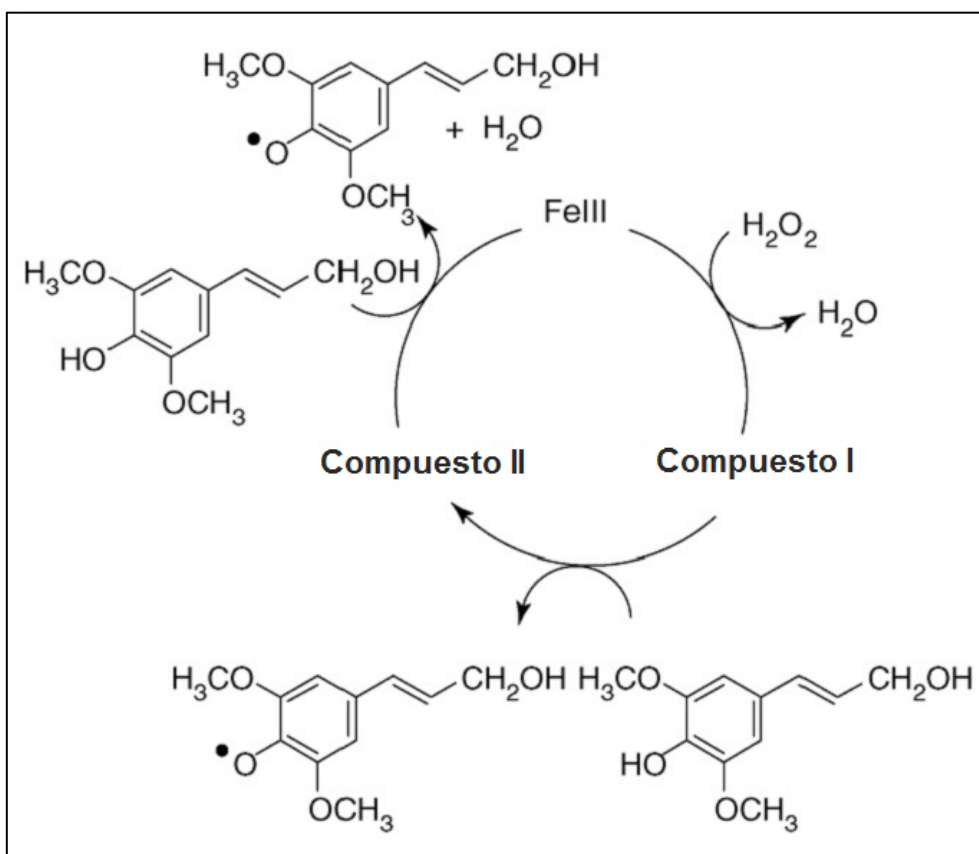


Figura I.8. Ciclo catalítico de las peroxidasas durante la oxidación del alcohol sináptico a su radical 4-O, ilustrando la formación de los intermediarios de la enzima, los compuestos I y II. Adaptado de Ros Barceló *et al.* (2007).

I.2.4 Función y localización

Debido a la existencia de diferentes isoenzimas y a la alta diversidad de sustratos *in vitro*, las funciones fisiológicas de las peroxidasas están todavía por entenderse totalmente, aunque se conoce que actúan en diversos lugares y rutas.

Las funciones en las que se encuentran implicadas las peroxidasas son, entre otras, la formación de pared celular en procesos de lignificación (Lagrimini *et al.*, 1987), suberización (Roberts y Kolattukudy, 1989) y polimerización de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Bradley *et al.*, 1992), regulación de la elongación celular (Greppin *et al.*, 1986), respuesta a estrés bióticos como cicatrización de heridas (Lagrimini y Rothstein, 1987), y en general defensa frente a patógenos (Chittoor *et al.*, 1997; Caruso *et al.*, 2001; Shivakumar *et al.*, 2003), estreses abióticos producidos por toxicidad a NaCl (Sreenivasulu *et al.*, 1999) y al aluminio (Jan *et al.*, 2001) en donde se producen radicales libres y peroxidación de lípidos de membranas, en la detoxificación de especies activas del oxígeno (Zapata *et al.*, 1998; Casano *et al.*, 2000), en la degradación de clorofilas (Martínez *et al.*, 2001), en la germinación (Bellani *et al.*, 2002), crecimiento celular (Cosgrove, 2001) y metabolismo de hormonas (Cosio y Dunand, 2009).

Una de las funciones que más se ha estudiado de la peroxidasa es en procesos de lignificación, como veremos más adelante, y suberización de la pared celular (Ros Barceló, 1995) y en donde estaría implicada una NADPH oxidasa, formando H_2O_2 , en la síntesis de ligninas en el xilema (Ros Barceló, 1998a). Existe otra oxidasa (lacasa, benzenodiol: O_2 oxidoreductasa, E.C. 1.10.3.2), la cual puede catalizar reacciones similares de polimerización de monoligninas pero usando O_2 en lugar de H_2O_2 como aceptor de electrones, y que también podría estar implicada en la formación de ligninas, pero en menor medida (Wallace y Fry, 1999).

Las peroxidasas también están implicadas en la interacción planta-patógeno (Castillo, 1992; Yubedee, 1998) y en reacciones de defensa en las que oxidan compuestos fenólicos que inhiben actividades enzimáticas, como pectinasas y enzimas proteolíticas de patógenos (Hammerschmidt *et al.*, 1982). Existen estudios que correlacionan el contenido de compuestos fenólicos y actividad peroxidasa con la resistencia o susceptibilidad de la planta frente a patógenos (Yubedee y Arinze, 1994; Yubedee, 1998). Relacionado con los mecanismos de defensa y la formación de pared,

están los mecanismos de “cicatrización de heridas” en los que la peroxidasa también está implicada (Diehn *et al.*, 1993; Hiraga *et al.*, 2000)

Además, algunos estudios muestran una asociación de las peroxidases con la producción de peróxido de hidrógeno (Bolwell *et al.*, 1995) y su eliminación (Kvaratskhelia *et al.*, 1997; Zapata *et al.*, 1998), el metabolismo de las porfirinas (Dayan *et al.*, 1999), senescencia (Abeles *et al.*, 1990; Oh *et al.*, 1997) y organogénesis (Siegel, 1993).

En cuanto a su localización, la peroxidasa es una enzima que presenta una compartimentalización tisular muy específica. Así la peroxidasa está localizada en los tejidos meristemáticos (Crevecoeur *et al.*, 1997), en las células epidérmicas (Goldberg *et al.*, 1987; Hendriks y van Loon, 1990; Ferrer y Ros Barceló, 1994a) y vasculares (Czaninski y Catesson, 1969; Ros Barceló *et al.*, 2002a). 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 *et al.*, 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 *et al.*, 1997), cambiales (Ros Barceló *et al.*, 1991) y del mesófilo (Sottomayor y Ros Barceló, 1997), las peroxidases están principalmente localizadas en la vacuola, bien en forma soluble (Crevecoeur *et al.*, 1997) o bien firmemente ligadas a la cara interna del tonoplasto (Ros Barceló *et al.*, 1991, Sottomayor y Ros Barceló, 1997). Esta situación es ligeramente diferente en las células epidérmicas y del xilema, donde la peroxidasa está localizada principalmente en las paredes celulares, tanto en las paredes celulares primarias (Goldberg *et al.*, 1987), fundamentalmente a nivel de las esquinas celulares y la lámina media, como en los engrosamientos secundarios (Ros Barceló, 1995; Ros Barceló *et al.*, 2002a); 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 *et al.*, 1988).

Estas particularidades también conciernen a la compartimentalización de las isoenzimas de la peroxidasa. De hecho, es de resaltar que, mientras que el espectro completo de peroxidases (ácidas y básicas) se localiza en las paredes celulares, en las

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

I.2.5 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 *et al.*, 1987), tomate (Mohan *et al.*, 1993) y de *Populus kitakamiensis* (Osakabe *et al.*, 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 *et al.*, 1987; Dean y Eriksson, 1994, Tsutsumi *et al.*, 1994, Takahama, 1995, Bernards *et al.*, 1999), aunque existen excepciones (Christensen *et al.*, 1998, Quiroga *et al.*, 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 *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que, aunque las reacciones catalizadas por la peroxidasa están conducidas por fuerzas termodinámicas redox (Ros Barceló *et al.*, 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 peroxidasas ácidas está dificultada estéricamente debido a interacciones hidrofóbicas desfavorables entre los átomos metoxi del alcohol sinapílico y los residuos conservados I-138 y P-139 en el sitio de unión al sustrato de la enzima (Østergaard *et al.*, 2000; Ros Barceló *et al.*, 2007).

Este solapamiento aparentemente no ocurre en el sitio de unión al sustrato de las peroxidases ácidas que oxidan a la siringaldazina (Christensen *et al.*, 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 *et al.*, 1994; Bernards *et al.*, 1999; Quiroga *et al.*, 2000; Ros Barceló *et al.*, 2000; Ros Barceló y Pomar, 2001; Aoyama *et al.*, 2002), lo cual explicaría por qué la supresión antisentido de las peroxidases básicas en plantas transgénicas disminuye tanto los niveles de unidades G como de S (Blee *et al.*, 2003), mientras que la supresión antisentido de ciertas peroxidases ácidas sólo produce la disminución de los niveles de unidades G (Li *et al.*, 2003).

En 2007, Ros Barceló *et al.* describieron 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 I.9).

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 *et al.*, 2006), 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 *et al.*, 2007).

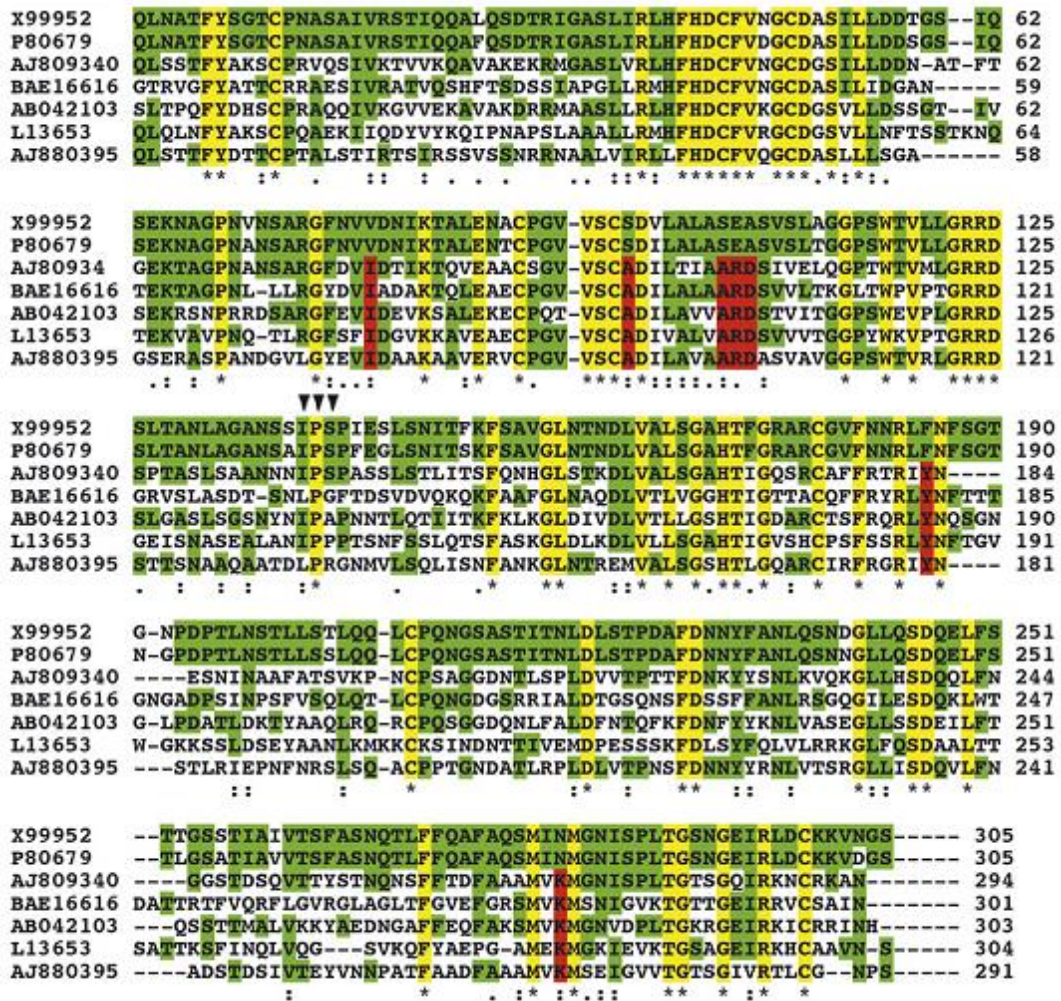


Figura I.9. Alineamientos estructurales de peroxidasas tipo siringilo y guaiacilo. Los motivos estructurales de las peroxidasas S (en rojo) se determinaron alineando la peroxidasa de *Z. elegans* (AJ880395) con las de tomate (L13653), espárrago (AB042103), álamo (BAE16616) y píceas (AJ809340) frente 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 *et al.*, 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 I.10). La hélice D' está ausente en las peroxidosas de tipo siringilo estudiadas (Gómez Ros *et al.*, 2007a). Esta observación puede constituir la piedra angular de la diferente especificidad de sustrato de las siringil-peroxidosas, ya que, en la ATP A2, la hélice D' fija la posición del grupo prostético (Østergaard *et al.*, 2000). La ausencia de la hélice D' en las siringil-peroxidosas 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 *et al.*, 2000).

La lámina-βI, que aparece en la peroxidasa ATP A2, está ausente en todas las siringil-peroxidosas, en las cuales surgen nuevas láminas-β (Gómez Ros *et al.*, 2007a). Estas nuevas láminas-β 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 *et al.*, 2007).

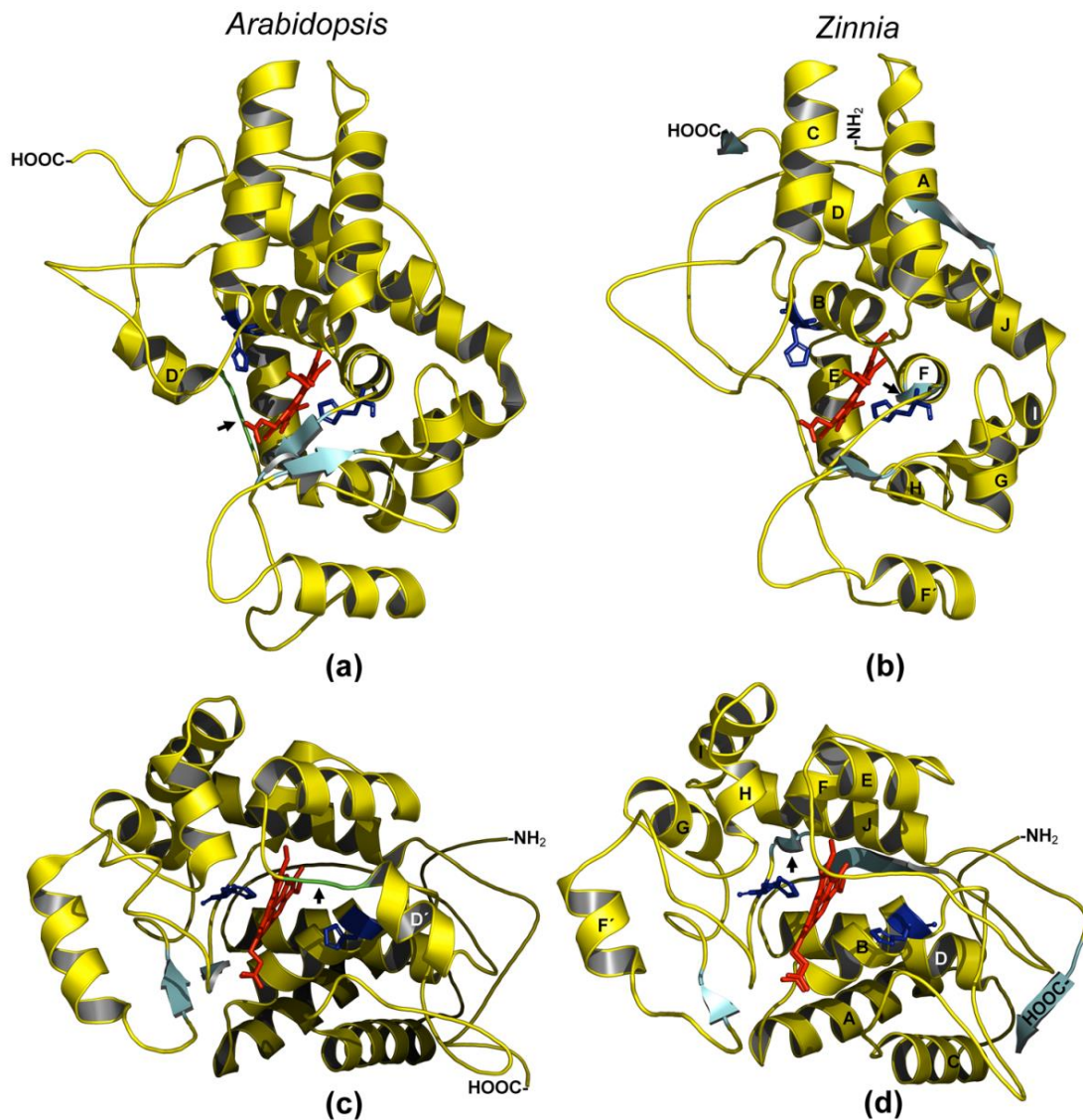


Figura I.10. Estructura tridimensional de la ATP A2 (a) y (c) y de ZePrx (b) y (d). Las hélices α están mostradas en amarillo. El motivo IPS aparece señalado en verde y con flechas en (a) y (c). Las láminas β aparecen en azul, mientras que las nuevas láminas β que aparecen en (b) y (d) se muestran con flechas. El grupo hemo se muestran en color rojo, mientras que las histidinas proximal y distal aparecen en azul. Tomado de Ros Barceló *et al.* (2007).

I.2.6 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 cinamílicos, diversos estudios realizados con plantas transgénicas de tabaco muestran que una reducción significativa en la expresión de una isoenzima ácida de la peroxidasa no viene acompañada de una reducción de la lignificación (Lagrimini, 1991), 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 cinamílicos es la de presentar una correlación cuantitativa con la lignificación. En el caso de las peroxidasas, esta correlación ha sido frecuentemente descrita en el endocarpo de melocotón (Abeles y Biles, 1991), en fibras de lino (McDougall, 1992), en álamo (Baier *et al.*, 1993), en agujas de píceas noruegas (Polle *et al.*, 1994) y en células en suspensión de *Zinnia* durante la diferenciación en traqueidas (Sato *et al.*, 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 μM (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 *et al.*, 1993), y se encuentran dentro del orden (5-500 μM) de los valores de afinidad mostrados por las enzimas precedentes en la ruta biosintética

(Dharmawardhana *et al.*, 1995). En este punto, no se debe olvidar que los valores de k_M de las peroxidasas con respecto al alcohol coniferílico presentan una cierta dependencia de la concentración de H_2O_2 , siendo proporcionalmente menor al descender la concentración de H_2O_2 (Ros Barceló, 1998b). De hecho, los valores de k_M mostrados para el H_2O_2 por muchas peroxidasas, cuando se usan concentraciones de alcohol coniferílico entre 30 y 160 μM (Takahama 1993; Ros Barceló, 1998b), sugieren que dichas enzimas se encuentran muy bien adaptadas a trabajar en presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 .

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

1.2.7. La peroxidasa básica de *Zinnia elegans*

El último paso en la biosíntesis de la lignina, que implica la oxidación de los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos para formar los diferentes monómeros, está catalizado por lacasas y, sobre todo, por peroxidasas (Ros Barceló, 1997). A principios de los años 80, Fukuda y Komamine (1982) describieron que la actividad peroxidasa está correlacionada con la formación de los elementos traqueales. Describieron un pico de

actividad peroxidasa, específicamente en la fracción de pared celular, previa a la lignificación, y durante la biosíntesis de lignina. Por tanto, la peroxidasa se considera como un marcador de la transdiferenciación de las células del mesófilo. Sin embargo, no fueron capaces de asociar una isoenzima específica con este proceso. Church y Galston (1988) identificaron una peroxidasa catiónica como marcador en el proceso de transdiferenciación, describiendo la presencia de esta isoenzima antes de la lignificación y de la aparición de los elementos traqueales. Sato *et al.* (1995a) consiguieron correlacionar una peroxidasa catiónica con la formación de la lignina, por medio de la afinidad por el sustrato y la abundancia de esta isoenzima durante la formación de los elementos traqueales. Más tarde, esta peroxidasa se purificó a partir de raíces de *Zinnia* y su secuencia de aminoácidos fue parcialmente resuelta (Sato *et al.*, 1995b). Otras evidencias de la participación de las peroxidases en la diferenciación de los elementos traqueales de *Zinnia*, en este caso logrado mediante metodologías de expresión génica, provino de los experimentos de Demura *et al.* (2002), quienes realizaron un análisis de microarrays de una biblioteca de cDNA obtenido a partir de cultivos de células de *Zinnia* transdiferenciadas en elementos traqueales. Aunque no llegaron a caracterizarla, informaron sobre la expresión específica de una única peroxidasa durante la etapa en la que se llevaba a cabo la lignificación de la pared celular secundaria.

Uno de los principales interrogantes, en relación a la diferenciación de los elementos traqueales, se encuentra en la confirmación de que el proceso de transdiferenciación que se produce en las células del mesófilo, también se lleva a cabo en la diferenciación de las células del xilema en plantas. De hecho, el engrosamiento de la pared celular secundaria difiere en el xilema lignificante y en los cultivos de células traqueales, lo que sugiere la existencia de diferentes redes de señales que controlan el engrosamiento de la pared celular en los dos sistemas. López-Serrano *et al.* (2004) identificaron una peroxidasa fuertemente catiónica en hipocotilos, tallos y hojas de *Zinnia*, que casualmente se ubica en la pared celular. A su vez encontraron una peroxidasa fuertemente catiónica expresándose específicamente durante la transdiferenciación de las células del mesófilo de *Z. elegans*. Esta peroxidasa estaba ausente en las células del mesófilo y del medio de cultivo que no se someten a transdiferenciación. Basándose en el patrón de isoenzimas obtenido por isoelectroenfoque (IEF), la peroxidasa fuertemente básica expresada durante la diferenciación de los elementos traqueales en *Zinnia* es la misma que se expresa en los

tallos y los hipocotilos. López-Serrano *et al.* (2004) llegaron a la conclusión de que la peroxidasa básica expresada durante la formación de los elementos traqueales era un marcador de este proceso y, más aún, *Z. elegans* utiliza una única peroxidasa para la lignificación del xilema, lo que sugiere la existencia de un único programa de lignificación independientemente de las diferentes vías de ontogénesis. El hecho de que sólo una peroxidasa se exprese durante la diferenciación de los elementos traqueales, así como durante la lignificación del xilema, condujo a la posterior clonación molecular y caracterización de esta peroxidasa básica (Gabaldón *et al.*, 2005a). Estos autores desarrollaron anticuerpos específicos contra esta peroxidasa purificada, que revelaron específicamente una peroxidasa fuertemente catiónica que se expresaba en hipocotilos, en tallos y en los elementos traqueales. Estos datos confirmaron la suposición anterior de que la peroxidasa que se expresa en las células del xilema y en los elementos traqueales era la misma (Gabaldón *et al.*, 2005a).

Esta isoenzima de peroxidasa es capaz de oxidar tanto los alcoholes coniferílico y sinapílico, como el coniferilaldehído y el sinapilaldehído. Además, la versatilidad de esta enzima es tal que la preferencia de sustrato cubre los tres *p*-hidroxibenzaldehídos y los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos (Ros Barceló *et al.*, 2003). Sin embargo, los ácidos *p*-hidroxibenzoicos son peores sustratos de la enzima y su capacidad para oxidarlos se encuentra restringida al ácido siríngico.

La afinidad de esta peroxidasa de naturaleza fuertemente básica por los alcoholes *p*-hidroxicinámicos, y sus correspondientes aldehídos, es similar (Ros Barceló y Pomar, 2001) a la mostrada por las enzimas precedentes de la ruta de biosíntesis de las ligninas (la *CAld5H* y la *CAD*), que también usan los alcoholes *p*-hidroxicinámicos y sus correspondientes aldehídos como sustratos. Estos resultados indican que la ruta de biosíntesis de las ligninas no presenta sumideros metabólicos en los que los sustratos puedan acumularse, como se desprende de los flujos metabólicos en las células lignificantes (Anterola *et al.*, 1999). Todo esto sugiere que esta peroxidasa juega un papel clave en la lignificación de la pared celular, lo cual está apoyado por su localización en el xilema (Ros Barceló *et al.*, 2000 y 2002b; López Serrano *et al.*, 2004).

En este punto, cabe mencionar que la versatilidad que presentan ciertas enzimas es una de las fuerzas motrices de la evolución de las plantas terrestres, y hoy día existe un consenso general (Boerjan *et al.*, 2003) de que las peroxidases confieren una elevada

plasticidad metabólica a la ruta biosintética de las ligninas. En el caso de esta peroxidasa básica, el significado real de su versatilidad parece ser el siguiente: la existencia en plantas de esta peroxidasa capaz de catalizar con alta afinidad y elevada actividad catalítica la polimerización de los tres alcoholes *p*-hidroxicinamílicos y de los tres ácidos *p*-hidroxicinámicos, y sus correspondientes derivados, hace que la heterogeneidad de los precursores de las ligninas no sea prohibitiva, ni suponga un elevado coste metabólico para la planta. De hecho, la versatilidad (plasticidad metabólica) de esta peroxidasa básica confiere un cierto sentido a la heterogeneidad de la ruta de biosíntesis de las ligninas. El hecho de que la proteína se exprese en hipocotilos, tallos y cultivos celulares de *Z. elegans* (Gabaldón *et al.*, 2005a) sugiere que esta proteína no sólo cumple todos los requerimientos catalíticos para estar implicada en la lignificación superando todas las restricciones impuestas por el paso de polimerización, sino que también su expresión es inherente a la lignificación. La naturaleza de su pI básico no es algo excepcional, ya que las peroxidasas básicas se expresan diferencialmente durante la lignificación en otros sistemas modelo (Quiroga *et al.*, 2000; Holm *et al.*, 2003), mostrando propiedades bioquímicas inusuales y únicas como la oxidación de los residuos siringilo (Aoyama *et al.*, 2002).

I.3 *Zinnia elegans* y *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo en lignificación

Aunque la formación del leño (xilema secundario) es una característica evidente en árboles, muchas especies herbáceas también desarrollan cambium vascular y xilema secundario, como es el caso de *Zinnia elegans* (Fukuda, 1996) y *Arabidopsis thaliana* (Oda *et al.*, 2005). Estas dos especies ofrecen la posibilidad de trabajar con cultivos celulares que se asemejan a las células en diferenciación del xilema y constituyen modelos excepcionalmente útiles para supervisar la expresión de enzimas de la ruta de biosíntesis de ligninas, especialmente la parte que concierne a los esqueletos fenilpropanoides (Demura *et al.*, 2002; Milloni *et al.*, 2002).

Z. elegans es una especie perteneciente a la familia de las asteráceas, que se considera como una de las familias más evolucionadas dentro de las angiospermas.

Esta especie ha sido utilizada frecuentemente como modelo en los estudios de lignificación de la pared celular debido, fundamentalmente, a la facilidad con la que cultivos de células de mesófilo de esta especie se diferencian, bajo un control hormonal adecuado, en una población sincronizada de traqueidas. El patrón de lignificación de *Z. elegans* es único ya que, en un momento específico del desarrollo, ofrece simultáneamente dos modelos de lignificación que se asemejan a los que ocurren en gimnospermas y angiospermas. De este modo, las plántulas de *Z. elegans*, a determinado estadio de su desarrollo (25-30 días de edad) muestran dos modos diferentes de lignificación en la misma planta (figura I.11).

Por un lado, la composición del hipocotilo se parece a la que ocurre en angiospermas, mientras que la composición del epicotilo se parece parcialmente a la encontrada en gimnospermas, debido a que las unidades H+G llegan a constituir el 78% de las unidades de lignina.

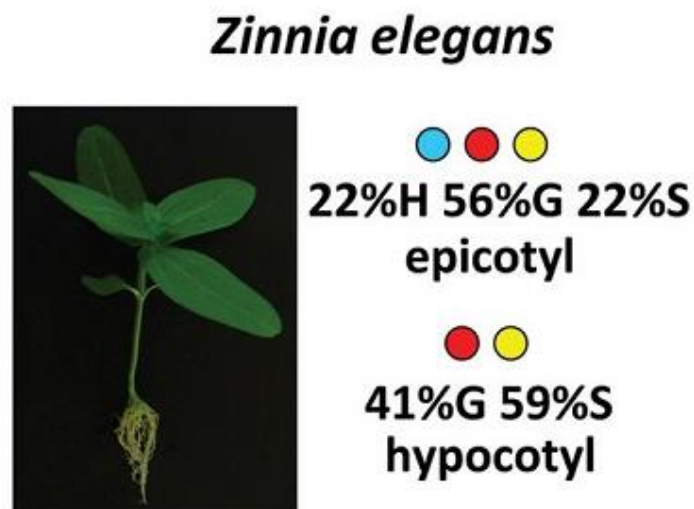


Figura I.11: Diferencias en la composición de monómeros de lignina entre los epicotilos e hipocotilos en *Zinnia elegans*. Tomado de Novo-Uzal *et al.* (2013).

En *Z. elegans* se ha identificado, caracterizado molecular y funcionalmente y clonado una peroxidasa fuertemente básica la cual se la considera responsable del proceso de lignificación en esta planta (López-Serrano *et al.*, 2004; Gabaldón *et al.*, 2005a, 2006). Durante la diferenciación de las células del mesófilo en cultivo a traqueidas, éstas sufren una intensa lignificación, actuando esta peroxidasa de punto isoeléctrico fuertemente básico como marcador molecular de este proceso. Esta misma

peroxidasa se expresa tanto en tallos como en hipocotilos jóvenes de la planta, y es la única isoenzima de peroxidasa que aparece en estudios de polimorfismo. Por este motivo, *Z. elegans* constituye, junto a otros miembros de la familia de las asteráceas (en donde también cabe incluir plantas de interés agrícola como el girasol o la alcachofa), una planta donde la peroxidasa se presenta con una sola isoenzima. Indudablemente, este hecho hace de *Z. elegans* una especie idónea, y casi insustituible, para estudiar la función fisiológica de la peroxidasa y más concretamente su participación en la biosíntesis de las ligninas.

Sin embargo, *Z. elegans* es una planta sumamente recalcitrante a los fenómenos de transformación mediante la técnica de T-DNA con *Agrobacterium tumefaciens* lo cual limita las posibilidades de estudio del proceso de lignificación.

A su vez, existen problemas prácticos que impiden el uso de especies arbóreas para el estudio de los mecanismos genéticos que gobiernan la lignificación, principalmente debido a su lento crecimiento y los largos tiempos entre generaciones. Todo ello hace que la producción y aislamiento de mutantes de especies de árboles sea muy laborioso en tiempo y en trabajo. Con el fin de abordar estos problemas asociados a la investigación con árboles y los problemas que tiene *Z. elegans* a nivel genético, se ha propuesto a *Arabidopsis thaliana* como planta modelo para investigar las bases genéticas de la formación de la madera (lignificación) (Tixier *et al.*, 2013) y del desarrollo del xilema (Nieminen *et al.*, 2004).

En *A. thaliana*, el crecimiento secundario puede darse en la raíz, en el hipocotilo y en el tallo de la inflorescencia, y se ha visto que su arquitectura es muy similar a la que ocurre en especies arbóreas, por ejemplo en *Populus* (Chaffey *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011) (figura I.12). También se ha visto que existe una elevada conservación de los genes implicados en el desarrollo del xilema secundario en *Arabidopsis* y en coníferas (*Pinus taeda*) lo cual sugiere que los mecanismos genéticos que subyacen en el desarrollo del xilema están altamente conservados entre las especies arbóreas y las plantas herbáceas (Nieminen *et al.*, 2004). Por tanto, *A. thaliana* es una perfecta planta modelo para los estudios de lignificación, solventando los problemas que ocurren en *Z. elegans* y en las especies arbóreas de gran porte.

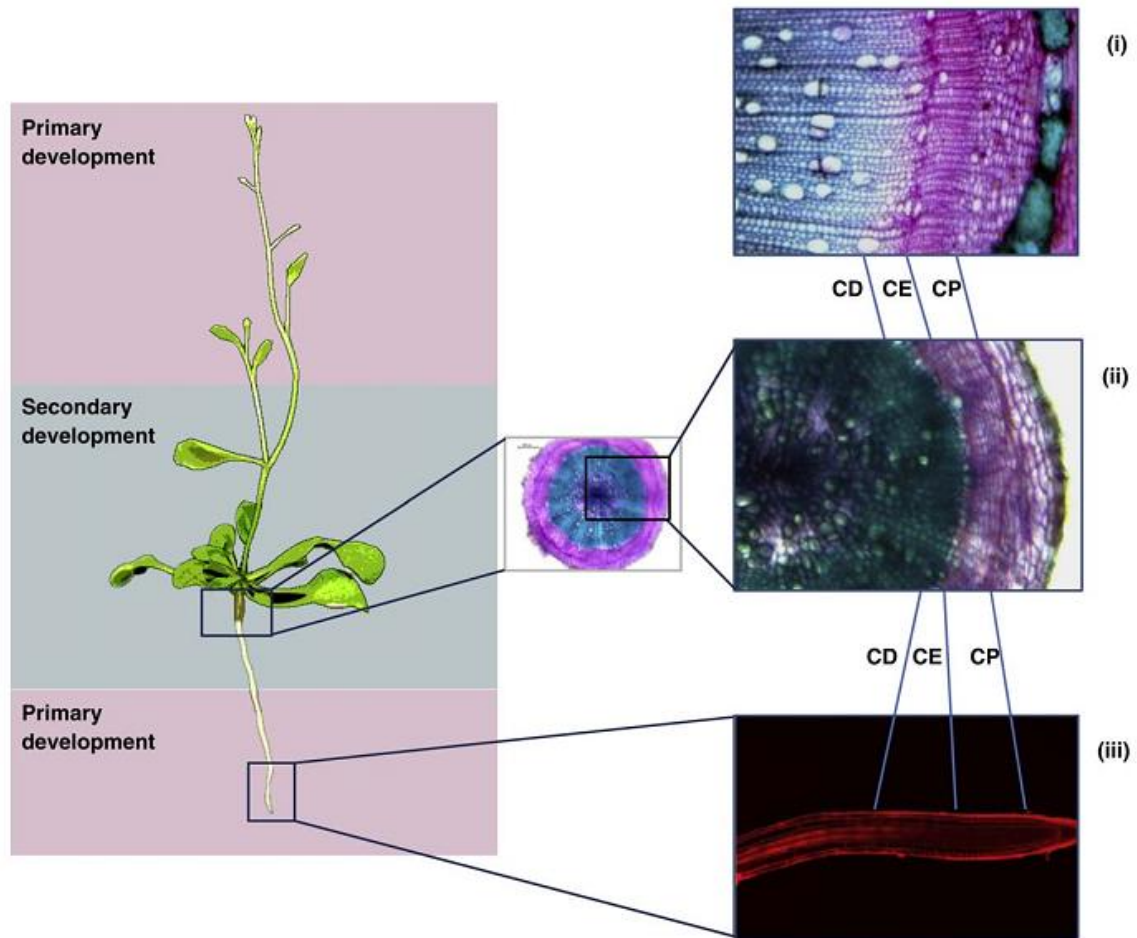


Figura I.12. Anatomía del tejido primario y secundario de *Arabidopsis* en comparación con *Populus*. Se pueden identificar las mismas fases de desarrollo en secciones transversales de (i) tallo de *Populus* y (ii) hipocotilo de *Arabidopsis* de 6 semanas, ambos representando el desarrollo vascular secundario, así como (iii) el desarrollo vascular primario en un corte de raíz de *Arabidopsis* visto al microscopio confocal. CP: zona de proliferación celular; CE: zona de expansión (elongación) celular; CD: zona de diferenciación celular. Tomado de Zhang *et al.* (2011).

Estudios recientes, han identificado los mismos factores reguladores del crecimiento primario y secundario de la pared celular en plantas herbáceas y en árboles. Debido a estas semejanzas en el patrón del desarrollo vascular entre *Arabidopsis* (herbáceas) y *Populus* (árboles) se ha demostrado que los mecanismos reguladores del desarrollo del xilema han sido conservados durante la evolución y pueden ser plenamente explotados e incorporados en los estudios de formación del leño. De esta forma, a través de aproximaciones genómicas en *Arabidopsis* podemos identificar genes candidatos a estar implicados en el desarrollo vascular en árboles y caracterizarlos (Tixier *et al.*, 2013).

Se calcula que el 10% de los genes en *A. thaliana* están implicados en la biosíntesis o modificación de la pared celular, y que la mayoría de ellos pertenecen a familias multigénicas como es el caso de la peroxidasa. Por tanto, la posibilidad de trabajar con líneas de mutantes *knock-out* de *A. thaliana* nos permite hacer un barrido de una gran cantidad de genes implicados en el desarrollo del xilema (Tixier *et al.*, 2013).

A su vez, numerosos estudios han empleado los reguladores del desarrollo vascular de *Arabidopsis* en otras especies de árboles lo que ha permitido comprender y manipular genéticamente la formación del leño en las plantas (Zhang *et al.*, 2011)

Recientemente, Tixier *et al.*, en 2013, demostraron que *A. thaliana* comparte características tanto estructurales como funcionales con muchas eudicotiledóneas, lo cual, junto a su pequeño tamaño del tallo de la inflorescencia, facilita entre otras muchas cosas, estudios sobre la ruta hidráulica del xilema en comparación con grandes árboles.

I.4 La lignificación como sumidero de carbono de la fotosíntesis

Varias publicaciones sugieren que la biosíntesis de ligninas está bajo control del suministro de carbono, que está directamente vinculado a la luz y la actividad fotosintética. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la expresión de los genes de biosíntesis de monolignoles sigue un ciclo diurno, durante el cual la expresión alcanza su punto máximo dos veces al día (Rogers *et al.*, 2005). Mientras que algunos genes necesitan el periodo oscuro para la inducción estimulada por luz, otros son insensibles a los cambios

de luz, estando presumiblemente bajo control circadiano (Harmer *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2005). La disponibilidad de sacarosa fue identificada como un factor importante para controlar la magnitud de las oscilaciones, y se propuso que la señalización tiene lugar a través de derivados de hexosas de glucosa y fructosa, los productos de degradación de sacarosa (Rogers *et al.*, 2005).

Asimismo, la luz activa el metabolismo fenilpropanoide en las raíces de *Arabidopsis*, lo que resulta en una acumulación ectópica de glucósidos de monolignol y flavonoides (Hemm *et al.*, 2004). Para ello, los fotorreceptores fitocromo B (PHYB) y criptocromo 2 (CRY2) son necesarios para la activación, junto con el factor de transcripción de hipocotilo elongado 5 (HY5).

Estudios en álamos híbridos transgénicos (Coleman *et al.*, 2008) han demostrado la relación fuente-sumidero que existe entre la lignificación y la fotosíntesis al demostrar que árboles transgénicos de la ruta de biosíntesis de ligninas mostraban una tasa fotosintética disminuida de hasta un 11% menos respecto al ecotipo silvestre.

Los cambios inducidos en la ruta de lignificación altera la fisiología de la planta de diferentes maneras, desde una acumulación de carbohidratos en las hojas (Coleman *et al.*, 2008), elevados niveles de celulosa, cambios en el ratio entre ligninas S/G (Hancock *et al.*, 2007), o bien hiperacumulación de fenilpropanoides (flavonoides, ésteres de *p*-cumarato) y otros (Franke *et al.*, 2002; Besseau *et al.*, 2007; Derikvand *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

I.5 Métodos de estudio de la fotosíntesis en plantas

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas, algas, cianobacterias y algunas bacterias convierten la energía radiante en energía química estable. La ruta de conversión de esta energía es compleja, incluyendo varios mecanismos físicos y químicos y varios componentes.

Los principales métodos de estudio de la fotosíntesis son el estudio de la fluorescencia de la clorofila *a* y los estudios de intercambio gaseoso.

I.5.1 Estudio de las curvas de inducción de fluorescencia de la clorofila *a* mediante el test JIP

La fotosíntesis se inicia cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos de los complejos antena de la membrana fotosintética. Parte de la energía absorbida es transferida como energía de excitación y atrapada por el centro de reacción, y la otra parte es disipada principalmente como calor y en menor grado re-emitida como energía luminosa de menor energía (fluorescencia). Esta distribución de la energía en los tres procesos ocurre simultáneamente, de tal forma que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos. Por lo tanto, a través de la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila *a* se puede obtener información de la eficiencia fotoquímica y la disipación térmica de la energía absorbida (Maxwell y Johnson, 2000; Kramer *et al.*, 2004).

Diversos factores físicos o químicos de estrés ambiental como temperaturas altas, heladas, sequía, cambios en la intensidad luminosa, salinidad, deficiencias nutricionales, presencia de metales pesados, detergentes, herbicidas y ozono entre otros, así como alteraciones en el genoma, afectan al funcionamiento del fotosistema II (PSII) de manera directa o indirecta, lo cual modifica la emisión de la fluorescencia. Por ello, los cambios en la emisión de la fluorescencia, pueden utilizarse para revelar presencia de estrés, cuantificación e identificación de efectos y respuestas al estrés e identificación de ciertos contaminantes y sus fuentes (Maxwell y Johnson, 2000; Strasser *et al.*, 2000).

Cuando se iluminan hojas, u otro tipo de muestra fotosintética, previamente mantenidas en oscuridad (durante unos 15 minutos), la intensidad de la fluorescencia de la clorofila *a* (Chl *a*) muestra cambios característicos denominados inducción de fluorescencia o efecto Kautsky (en honor del científico austriaco que lo descubrió en 1937). En las plantas superiores y en algas, la curva de inducción de fluorescencia medida bajo condiciones de luz continua tiene una fase rápida (de 1 segundo) de incremento, y una fase lenta (de unos minutos) de declive (Govindjee, 1995; Stirbet y Govindjee, 2011).

La fase rápida, denominada tránsito OJIP (del inglés *OJIP transient*), está relacionada principalmente con eventos primarios del PSII. Los cambios de fluorescencia durante esta fase rápida están correlacionados principalmente con los acontecimientos que tienen lugar en el curso de la reducción sucesiva de los aceptores

de electrones de la cadena fotosintética (Munday y Govindjee 1969 a, b; Strasser *et al.*, 1995; Strasser y Tsimilli-Michael, 1998; Strasser *et al.*, 2000, 2004; Lazár, 1999; Papageorgiou *et al.*, 2007; Stirbet y Govindjee, 2011, 2012).

El nombre de “curva OJIP” referente a las curvas de inducción, procede de la forma estándar que adoptan las mismas (figura I.13): **O**, es el valor mínimo de la fluorescencia (F_0) que comienza a registrarse a los 10 μ s de comenzar un pulso de luz saturante (aproximadamente 3000 μ mol fotones $m^{-2}s^{-1}$) en fluorímetros de tipo PEA, en ese momento todos los centros de reacción (CRs) están oxidados si el material vegetal ha permanecido un tiempo suficiente en oscuridad y se dice que esos CRs están "abiertos", pues pueden aceptar electrones. **J**, es un punto de inflexión que se observa a los 2 ms ($F_J=F_{2ms}$) de comenzar el pulso saturante y está relacionada con la reducción de la quinona Q_A , según se deduce de estudios empleando DCMU (Stirbet y Govindjee, 2011). **I**, es un segundo punto de inflexión que aparece a los 20 ms ($F_I=F_{20ms}$) de iluminación y está relacionada con la reducción parcial de Q_B . **P**, es el valor máximo de la fluorescencia (F_m), cuando todos los CRs están cerrados (i.e., reducidos). El tiempo en el que se alcanza depende del protocolo experimental aunque en condiciones fisiológicas normales se alcanza en alrededor de 1s (figura I.13).

Muchos estudios experimentales y teóricos se han dedicado al análisis e interpretación de la fase rápida de la inducción de fluorescencia. El Prof. Strasser de la Universidad de Ginebra, ha desarrollado durante años el denominado test JIP, el cual puede ser utilizado como una herramienta rápida para obtener información sobre el estado de funcionamiento del aparato fotosintético a partir del análisis de las curvas de inducción (revisado en Strasser *et al.*, 2000; 2004). Este test tiene el potencial de ser utilizado para la caracterización del rendimiento cuántico de la fotoquímica del PSII, y la actividad del transporte de electrones. Además, el test JIP ha sido una excelente herramienta para medir los efectos específicos de diversos inhibidores, factores de estrés, y mutaciones en el aparato fotosintético y su función (Munday y Govindjee 1969 a, b; Strasser *et al.*, 1995, 2000, 2004; Lazár, 1999; Papageorgiou *et al.*, 2007; Stirbet y Govindjee, 2011, 2012).

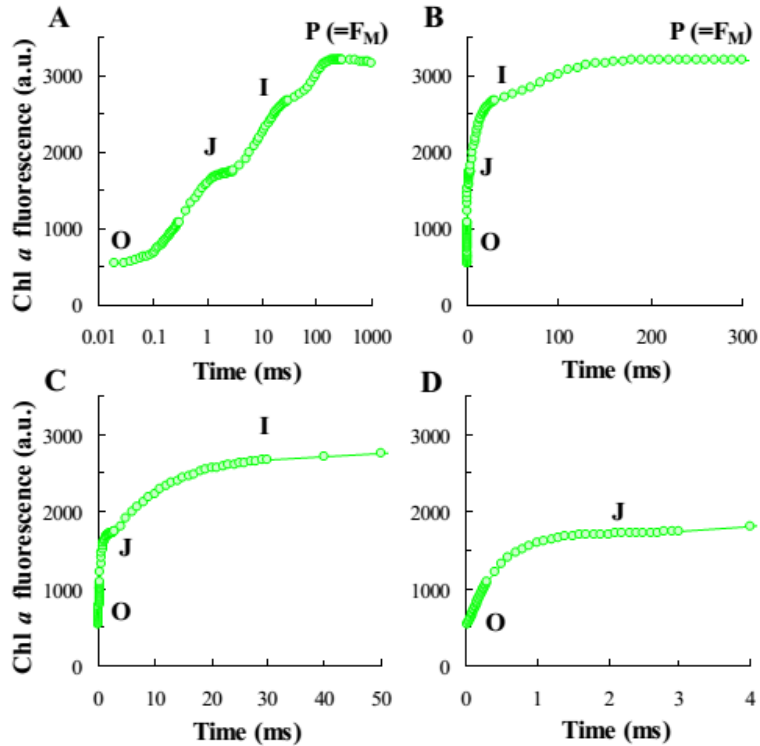


Figura I.13. Típica curva OJIP de fluorescencia de una hoja de guisante adaptada a la oscuridad medida a $3000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La misma curva es presentada en escala logarítmica (A) y a diferentes escalas lineares de tiempo (B-D). Tomado de Srivastava *et al.* (1995).

El análisis de la fluorescencia de la Chl *a* mediante la aplicación del test JIP proporciona información correspondiente a los diferentes flujos energéticos que se producen en el aparato fotosintético. Un modelo simplificado de estos los flujos energéticos se muestra en la figura I.14, donde el parámetro ABS representa la cantidad de fotones absorbidos por los pigmentos; la proporción de energía que alcanza el centro de reacción (RC) y que queda atrapada en éste viene representado por el parámetro TR (trapping = captura); la proporción de energía disipada como calor viene indicada por DI; la proporción de energía que se emplea en transporte electrónico hasta Q_A en el PSII es indicada por el parámetro ET; y por último, RE, representa el transporte electrónico más allá de Q_A , hasta los aceptores finales de electrones (Strasser *et al.*, 2000).

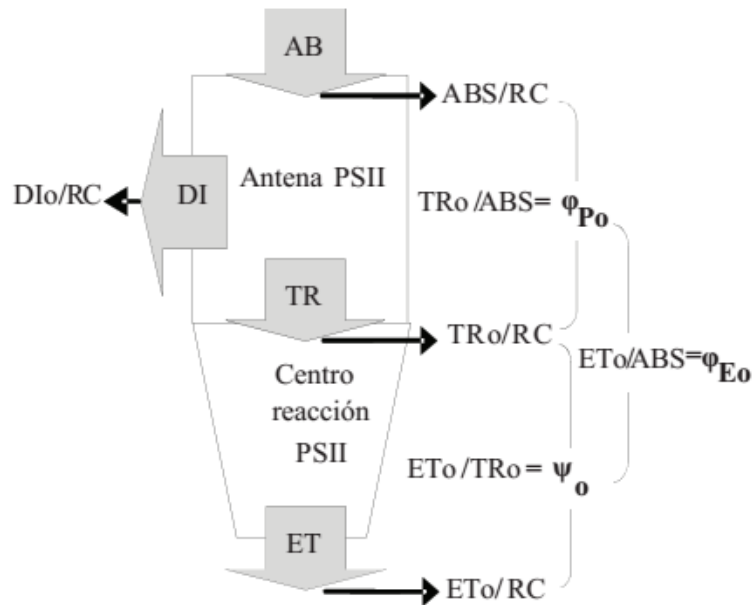


Figura I.14. Modelo simplificado de los flujos de energía en el aparato fotosintético. ABS se refiere a el flujo de fotones absorbido por los pigmentos de la antena (Chl*). Parte de esta energía de excitación se disipa como calor y en menor grado como emisión de fluorescencia y la otra parte es canalizada como flujo capturado TR por el centro de reacción y es convertido a energía redox, produciendo un transporte de electrones (ET) desde P680* hasta Q_A . A la derecha de la figura se ilustran parámetros derivados de los anteriores: rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria ($\phi_{Po} = TR_o/ABS = F_v/F_m$); eficiencia de la excitación atrapada por el CR para mover electrones a través de la cadena de transportadores electrónicos ($\psi_o = ET_o/TR_o$); y probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón en la cadena transportadora de electrones ($\phi_{Eo} = ET_o/ABS$). Tomado de Ceacero *et al.*, 2012, basado en un esquema de Strasser y Strasser (1995).

I.5.2 Estudio de la capacidad de fotosíntesis mediante el analizador de gases en el infrarrojo (IRGA)

La medida del intercambio de gases es una técnica comúnmente utilizada en la actualidad para fines comerciales y de investigación cuyo fin es medir la fotosíntesis en hojas individuales, plantas completas o suelo.

Las mediciones de intercambio gaseoso proporcionan medidas directas de la tasa neta de asimilación de carbono fotosintético. Las principales ventajas es que son medidas instantáneas, no destructivas, y directas (Long y Bernacchi, 1993; Long *et al.*, 1996; Flexas *et al.*, 2007).

Los sistemas de intercambio de CO₂ utilizan una cámara donde la hoja queda encerrada. La tasa de CO₂ fijado por la hoja se determina midiendo la variación en la concentración de CO₂ del aire que fluye a través de la cámara. Debido a que la concentración de CO₂ atmosférico es sólo 0,04 % (400 ppm), y es difícil medir el CO₂ captado por la fotosíntesis, estos aparatos utilizan sensores muy sensibles y por tanto, de precio elevado.

Las moléculas de gas heteroatómicas absorben radiación específica en la banda del infrarrojo (IR) de forma que cada gas tiene un espectro de absorción característico. Los analizadores de gas por infrarrojos (IRGA) miden la reducción en la transmisión en el IR provocada por la presencia de CO₂ entre la fuente de radiación y el detector.

La reducción en la transmitancia es función de la concentración de CO₂ (ley de Lambert-Beer). El único gas normalmente presente en el aire con un espectro de absorción que se superpone al del CO₂ es el vapor de agua. Puesto que el vapor de agua está normalmente presente en el aire en concentraciones mucho más altas que el CO₂, esta interferencia es significativa, pero se puede eliminar simplemente por secado del aire o midiendo la concentración de H₂O por otro detector incorporado en el mismo aparato, permitiendo la corrección de la interferencia por el software del aparato (Long y Bernacchi, 1993; Long *et al.*, 1996).

Existen dos tipos de sistemas para la medida de fotosíntesis mediante la medida del intercambio de gases: sistemas cerrados y sistemas abiertos.

Los sistemas abiertos son los más utilizados (figura I.15) y en ellos el aire procedente del exterior se hace pasar continuamente a través de la cámara donde está la hoja (para mantener una concentración fija de CO₂) y las mediciones de fotosíntesis y transpiración se basan en las diferencias en CO₂ y H₂O entre la corriente de aire que entra en la cámara de la hoja (niveles de referencia) y la corriente de aire que sale de ella (niveles de análisis). La tasa de captación de CO₂ se utiliza para evaluar la tasa fotosintética de asimilación de carbono mientras la tasa de pérdida de agua se utiliza para evaluar la tasa de transpiración.

Este tipo de sistemas son los más utilizados y ha sido el empleado en esta Tesis Doctoral para la evaluación de la actividad fotosintética.



Figura I.15. Analizador de gases en el infrarrojo modelo LC Pro⁺ de ADC BioScientific Ltd. (Herts, Inglaterra) de sistema abierto como el utilizado en esta Tesis.

II. Objetivos

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

I. El primer objetivo será determinar cuántas de las 73 peroxidasas de *Arabidopsis thaliana* son homólogas a la peroxidasa de *Zinnia elegans*. Sólo se considerarán objeto de estudio aquellas peroxidasas de *A. thaliana* que presenten homologías superiores a $1e-80$ (*E-valor*) con la peroxidasa de *Z. elegans*. Los criterios de selección se harán más restrictivos al incluir como factores de sesgo irrenunciables los determinantes estructurales de la estructura primaria, secundaria y terciaria que condicionan las peculiares propiedades catalíticas de la peroxidasa de *Z. elegans* (Ros Barceló *et al.*, 2007), y que son compartidas por otras peroxidasas implicadas en la lignificación. Con este fin, se realizarán, aparte de los alineamientos correspondientes de la estructura primaria, modelos 2D y 3D de las peroxidasas de *Arabidopsis*. Se analizarán los niveles de expresión de estas peroxidasas mediante el análisis de las regiones reguladoras (elementos *cis*) del promotor.

II. El segundo objetivo será obtener mutantes de *Arabidopsis* para las peroxidasas homólogas a la de *Zinnia elegans*. Se seleccionarán mutantes *knockout* (noqueados) de los genes de peroxidasa de interés en las diferentes colecciones de mutantes de *Arabidopsis* generados por insertos aleatorios de T-DNA. Una vez identificados los mutantes en los genes de interés se adquirirán las semillas derivadas de la línea de inserción correspondiente (que se suministran como 25% homocigóticas para el mutante) bien al *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC), o al *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC). En estos centros también se localizará la línea silvestre (ecotipo Columbia, Col-0) que nos servirá de control.

Estas semillas se cultivarán y se propagarán según los métodos convencionales descritos para el cultivo de *Arabidopsis* (cultivo *in vitro* en medio mineral de MS) hasta aislar los mutantes 100% homocigóticos.

Finalmente, dentro de este objetivo, se compararán los niveles de expresión del gen de dicha peroxidasa en los mutantes homocigóticos con los de las plantas silvestres mediante las técnicas de RT-PCR en tiempo real (*Real Time RT-PCR*), utilizando sondas (o cebadores) específicos del citado gen de la peroxidasa.

III. El tercer objetivo será obtener la caracterización biométrica de los mutantes de peroxidadas de *Arabidopsis*. En este estudio fenotípico se determinará la altura de la inflorescencia principal desde la base de la roseta, número de tallos que surgen desde la base de la roseta, número de ramas laterales de cada tallo, área foliar de la roseta, producción de silicuas y tasa de germinación de las mismas. Las medidas se tomarán de forma manual y mediante fotografías que permitirán el análisis de imagen digital.

IV. El cuarto objetivo será conseguir la caracterización de los fenotipos de los mutantes de *Arabidopsis* versus la variedad silvestre en cuanto a su capacidad de fotosíntesis. Para ello se medirá la tasa de fotosíntesis con el sistema portátil LC Pro⁺. Simultáneamente se determinará el rendimiento cuántico del fotosistema II, y la atenuación fotoquímica y no fotoquímica mediante el estudio de la fluorescencia de la clorofila *a*, utilizando los protocolos puestos a punto en nuestros laboratorios. Ya que la lignificación es uno de los principales sumideros del CO₂ asimilado, estos estudios nos permitirán establecer si existe un sistema de inter-regulación entre la fotosíntesis y la lignificación en los mutantes de *Arabidopsis*.

III. Capítulo I: Análisis bioinformático de las peroxidasas de *Arabidopsis thaliana* implicadas en procesos de lignificación

III.1 Materiales y Métodos

III.1.1 Localización de las peroxidasas de *A. thaliana* (AtPrx) homólogas a ZePrx en las bases de datos

Se utilizaron las siguientes bases de datos para localizar información sobre las peroxidasas de *A. thaliana*, utilizando sus códigos de acceso: Arabidopsis Ensembl (<http://atensembl.arabidopsis.info>), National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/sprot/>), PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>) (Bakalovic *et al.*, 2006) y The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>).

La búsqueda de las proteínas de *Arabidopsis thaliana* homólogas a ZePrx, se hizo inicialmente utilizando sus secuencias proteicas mediante el programa BLASTP con un E-valor de corte fijado en 1e-80 (Altschul *et al.*, 1990).

III.1.2 Construcción del árbol filogenético

El análisis evolutivo se realizó con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando el método *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987), un método de distancias mediante el cual las distancias evolutivas se calculan para todos los pares de secuencias analizadas, formando una matriz de distancias por pares; el árbol filogenético se construyó por análisis de las relaciones entre estos valores de distancia (Wolf *et al.*, 2001).

III.1.3 Análisis de homología de secuencias y modelado molecular de las AtPrxs

El análisis de homología de secuencia se realizó utilizando los algoritmos de CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk>), y PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite>). Las secuencias proteicas se obtuvieron del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), del Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>) y de la base de datos de Peroxidasas de Clase III: PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>), (Bakalovic *et al.*, 2006).

Los modelos de peroxidasas se construyeron a partir de la estructura primaria de las correspondientes proteínas maduras, utilizando el servidor de modelado de proteínas

automatizado Fold and Function Assignment System (FFAS) (<http://ffas.burnham.org/>) (Ye *et al.*, 2003), de acuerdo a las similitudes de las secuencias modeladas con estructuras conocidas, disponibles en el banco de datos de proteínas (Protein Data Bank, PDB) (<http://www.rcsb.org>).

Las peroxidases se modelaron utilizando como estructuras modelo las peroxidases 1SCH (peroxidasa de cacahuete), 1FHF (peroxidasa de semilla de soja) y 1PA2 (peroxidasa A2 de *Arabidopsis thaliana*).

Se utilizó el algoritmo de verificación de estructuras proteicas ERRAT (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) para verificar la calidad de las estructuras modeladas.

A partir de estas estructuras tridimensionales (3D), las cargas superficiales se calcularon utilizando interacciones simples de Coulomb. La proteína se consideró a pH 7,0, con un estado de protonación por defecto para todos los residuos. Sólo los residuos cargados (R, K, E y D) se tuvieron en cuenta y las cargas se encuentran en las correspondientes posiciones de los átomos (sin H). Las cargas superficiales netas de las imágenes oscilaron entre -4,0 C (rojo) a + 4,0 C (azul). Los potenciales electrostáticos superficiales fueron asignados mediante el método de cálculo de Coulomb, suponiendo una constante dieléctrica (disolvente) de 80,000.

III.1.4 Análisis de la secuencia de los mRNAs

Se utilizó la información disponible en el TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) y en el Arabidopsis Ensembl (<http://atensembl.arabidopsis.info>) para recopilar información sobre las características de la secuencia de los mRNAs en cuanto a su vida media, información sobre los UTR y la longitud de la secuencia codificante, del número de intrones y su longitud. También se hizo una búsqueda manual para identificar las regiones ricas en AU, las señales Poly(A) y las secuencias DST.

III.1.5 Análisis de los promotores de las AtPrxs

La búsqueda de las secuencias de los elementos *cis* de ZePrx en los promotores

de las AtPrxs se realizó mediante el empleo de la base de datos PLACE (*Plant Cis-acting regulatory DNA Elements*) (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), una colección de los elementos reguladores conocidos en plantas (Higo *et al.*, 1999).

Debido a que no todas las secuencias reguladoras se encuentran en PLACE, se realizó paralelamente una búsqueda manual para identificar elementos *cis* adicionales.

III.2 Resultados y Discusión

III.2.1 Análisis BLAST y árbol filogenético

El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica 73 peroxidases. Para estudiar cuál de todas ellas están implicadas en el proceso de lignificación se ha empleado una aproximación por homología empleando la peroxidasa básica de *Zinnia elegans* (ZePrx) como modelo, una enzima implicada en procesos de lignificación como han demostrado numerosos estudios llevados a cabo por el equipo de investigación del Dr. Ros Barceló (Gabaldón *et al.*, 2005a, b). Para ello se realizaron análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.arabidopsis.org>) frente al genoma completo de *Arabidopsis thaliana*, utilizando la secuencia proteica de ZePrx como modelo. Posteriormente, con los resultados del análisis BLAST se hizo un alineamiento de la secuencia de interés y las peroxidases más homólogas encontradas en el estudio.

Los resultados del análisis se muestran en la tabla III.1. Se seleccionaron 10 peroxidases con E-valor menor de $1e-80$ con ZePrx. El E-valor nos permite definir qué alineamientos queremos obtener de acuerdo a su significación estadística. Cuanto menor sea el valor de E, más significativo es un alineamiento.

La peroxidasa 53 de *Arabidopsis* (AtPrx53, también conocida como ATPA2) ha sido ampliamente estudiada y caracterizada (Østergaard *et al.*, 1998, 2000; Nielsen *et al.*, 2001) y se ha demostrado que su comportamiento y propiedades difieren de ZePrx. Es por ello que AtPrx53 no será incluida en los resultados de esta Tesis.

El árbol filogenético de estas peroxidases se muestra en la figura III.1. Este árbol se basa en el alineamiento de las secuencias proteicas completas y los grupos formados están en la línea con los resultados publicados previamente por Tognolli *et al.* (2002) y Duroux y Welinder (2003).

De acuerdo con estos autores, podemos distinguir tres grupos de peroxidases. El primer grupo formado por AtPrx 4, 5, 52, 68 y 67 (en orden de homología con ZePrx), las peroxidases más importantes en nuestro estudio. A continuación AtPrx53 constituye el segundo grupo y AtPrx 36, 72, 14 y 49 el tercero. Estos resultados muestran la proximidad filogenética entre las peroxidases más cercanas a ZePrx.

Nombre	Código TAIR	Otros nombres	Código de acceso NCBI/UniProt	C-Term/destino predicho	pI/PM	Longitud proteína (AA)	Puntuación	E-valor
AtPrx4	AT1G14540	ATP46	NP_172906.1/Q9LE15	No/SP	7.6801/32315	315	342	1e-118
AtPrx5	AT1G14550		NP_172907.1/Q9M9Q9	No/SP	8.7309/32248	321	332	1e-114
AtPrx52	AT5G05340	ATP49	NP_196153.1/Q9FLC0	No/SP	8.2048/32107	324	327	2e-112
AtPrx68	AT5G58400		NP_200648.1/Q9LVL1	No/SP	9.7682/32454	325	289	1e-97
AtPrx67	AT5G58390	ATP44	NP_200647.1/Q9LVL2	No/SP	10.4029/32586	316	271	1e-90
AtPrx36	AT3G50990		NP_190668.2/Q9SD46	No/SP	4.5290/35273	344	262	8e-87
AtPrx14	AT2G18140		NP_179406.1/Q9SI17	No/SP	6.2992/34805	337	260	4e-86
AtPrx49	AT4G36430	ATP31	NP_195361.1/O23237	No/SP	8.5625/33711	331	259	4e-86
AtPrx53	AT5G06720	ATPA2	NP_196290.1/Q42578	No/SP	4.6199/31936	335	257	7e-85
AtPrx72	AT5G66390	ATP6a/PRXR8	NP_201440.1/Q9FJZ9	No/SP	8.5475/35004	336	254	9e-84

Tabla III.1. Peroxidasas de clase III de *Arabidopsis* que presentan mayor homología con la peroxidasa de *Zinnia elegans* (ZePrx) implicada en lignificación. Las peroxidasas están identificadas mediante sus correspondientes códigos TAIR, NCBI y UniProt, así como otros nombres que reciben. La información sobre el extremo C-terminal se ha obtenido de Valério *et al.* (2004). El punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (PM) de cada peroxidasa fue calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína madura mediante el programa iep del EMBOSS Package. EMBOSS version 2.0.1.

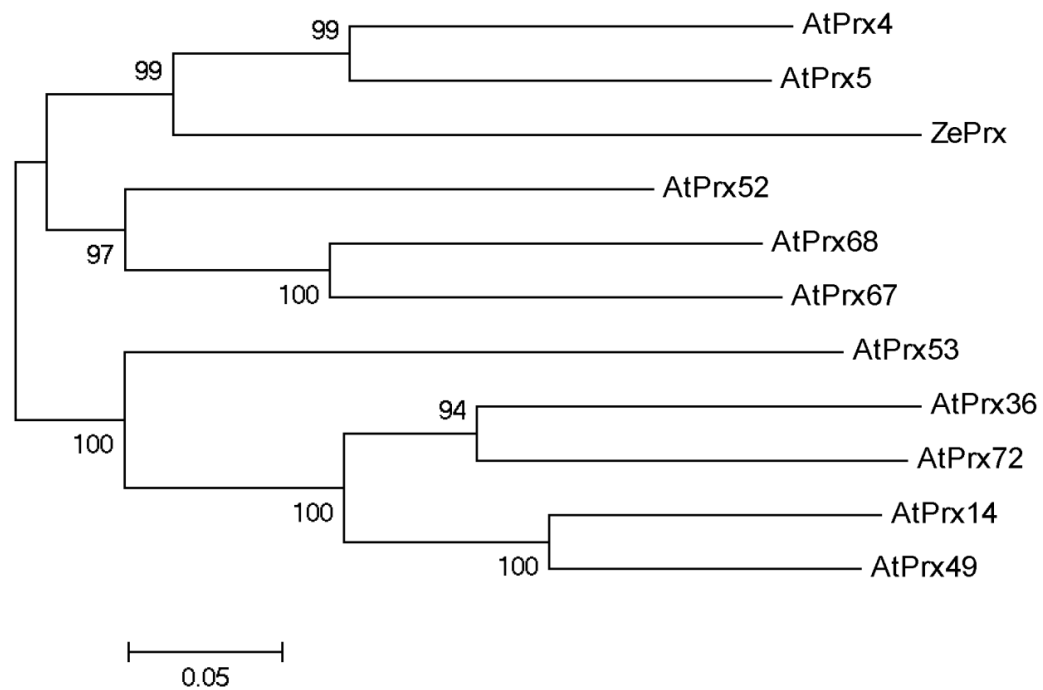


Figura III.1. Árbol filogenético de las peroxididasas de *A. thaliana* basado en el alineamiento de la secuencias proteicas completas. Ver Tabla III.1 para consultar los códigos y las referencias de las secuencias usadas para crear el árbol filogenético. La historia evolutiva fue desarrollada por el método *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud del ramal = 2,92887545. El porcentaje de árboles replicados para los cuales los taxa asociados se agruparon juntos en el test *bootstrap* (1000 réplicas) se muestra en las ramificaciones (Felsenstein, 1985). Este árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon mediante el método de la p-distancia (Nei y Kumar, 2000) y están en las unidades del número de diferencias de aminoácidos por sitio. El análisis se hizo con 11 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían lagunas o pérdidas de datos fueron eliminadas. Hubo un total de 279 posiciones en la hoja de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2001).

III.2.2 Elementos estructurales que debe contener una peroxidasa implicada en procesos de lignificación

Siguiendo un análisis desde la proteína hasta el gen se estudiaron las nueve peroxidosas con E-valor mayor (más negativo) a $1e-80$. Los ORF de los cDNAs completos se calcularon como puede verse en la figura III.2. El polipéptido maduro predicho comienza en QLS en AtPrx 4 y 5, DNN, QLR y QLN en AtPrx 52, 68 y 67 respectivamente, YQT en AtPrx36, DNA y DKS en AtPrx 14 y 49 respectivamente, y SKA en AtPrx72 (figura III.2, escrito en verde). Al igual que otras peroxidosas de clase III, todas ellas contienen la firma del centro activo de peroxidasa (figura III.2, subrayado en negro). También poseen una firma del ligando hemo proximal (figura III.2 subrayado en azul), junto con 8 cisteínas conservadas (C) (figura III.2, escrito en rojo), las cuales probablemente dan lugar a los cuatro puentes disulfuro característicos de todas las peroxidosas de clase III (Welinder *et al.*, 2002). Además, todas estas peroxidosas poseen uno o dos sitios de N-glicosilación (figura III.2, sombreado en amarillo), excepto AtPrx14, donde se encontraron cuatro sitios de glicosilación, lo cual junto con su pI ácido sugiere un comportamiento de esta peroxidasa bastante alejado de ZePrx. Además estas peroxidosas poseen al menos tres sitios de fosforilación de proteína kinasa C, cuatro o más sitios de fosforilación de caseín kinasa II, cuatro o más sitios de N-miristoilación y dos sitios de unión de Ca^{2+} , uno distal y otro proximal (figura III.2, escrito en azul; tabla III.2), característico de todas las peroxidosas de clase III (Welinder *et al.*, 2002).

La región N-terminal de una proteína es una zona activa de modificaciones co- y post- traduccionales, y está frecuentemente sujeta a rotura proteolítica co-traducciona. Las peptidasas que cortan estos extremos N-terminal dejan expuestos residuos que dependiendo de su naturaleza, pueden posteriormente llegar a ser sustratos para un conjunto de transferasas que modifican las cadenas laterales en los residuos N-terminal. Estas transferasas pueden acetilar, miristoilar, arginilar, desaminar o ciclar residuos en el extremo N-terminal de las proteínas (Walling, 2006), modificaciones las cuales pueden influir en la estabilidad de la proteína, localización o actividad.

```

                                H A
ZePrx      ----MSYHKSSGTILMVPLFMLLISVNYFMS----CNAQLSTTFYDTCPTALSTIRTS 51
AtPrx4     -----MAIFKILVLLSLCCFS-----QAQLSPTFYDQTQNALSTIRSS 40
AtPrx5     -----MERFSLRFVLMMSVSIILTSSIC-----QAQLSPTFYDQSCRNALSKIRSS 45
AtPrx52    -----MASNKLISILVVLVLLQLGDNNY---VVEAQLTTFYDTCPNLLSTVQTA 49
AtPrx68    ---MECYEQRQRRAAFVLLFVIMLGSQA-----QAQLRTDFYSDSCPSLLPTVRRV 49
AtPrx67    -----MLKVLLMMINMLASQS-----EAQLNRDFYKESCPSLFLVVRV 40
AtPrx36    MNTKTVKSMAGIVLSQISLVALFPLCICYQTHQSTSSVASLSPQFYENSCPNAQAIVQSY 60
AtPrx14    ---MARIGS---FLLLSLTYALTLCICDNASNFGGNKRNLFPDFYRSSCPRAAEIVRSV 54
AtPrx49    ---MARLTS---FLLLSLTCFVPLCLCDKSS---YGG---KLFPGYYAHSCPQVNEIVRSV 49
AtPrx72    ---MAKSLN-ILIAALSILAFSPFCLCSKAYGSG---GYLFPQFYDQSCPKAQEIQSI 52
          . . . * : * : * : . . .

```

```

                                H B                                H C
ZePrx      IRSSVSSNRRNAALVIRLLFHCFVQGCDAASLLLSGAG---SERASPAN-DGVLGYEVID 107
AtPrx4     IRTAISRRERRMAASLIRLHFHCFVNGCDASVMLVATPTMESERDSLAFNQSARGFEVID 100
AtPrx5     VRTAIAERERRMAASLIRLHFHCFVHGCDAASILLEGSTIESEERDALPNFKSVRGEVID 105
AtPrx52    VKSAVNSEARMGASLIRLHFHCFVNGCDGSILLDDTSSTFTGEQNAAPNRNSARGFEVID 109
AtPrx68    VQREVAKERRIAASLIRLHFHCFVNGCDASILLDDTRSFLGEKTAGPNNSVRYGYEVID 109
AtPrx67    VKRAVAREPRMGASLIRLHFHCFVNGCDGSLLLDDTSPFLGEKTSGPSNNSVVRGEVID 100
AtPrx36    VANAYFNDPRMAASLIRLHFHCFVNGCDASVLLDSSGMTSEKRSNANRDSARGFEVID 120
AtPrx14    VAKAFERETRMAASLIRLHFHCFVQGCDSLLLDTSIGSIVTEKNSNPNSRSARGFEVID 114
AtPrx49    VAKAVARETRMAASLIRLHFHCFVQGCDSLLLDSSGRVATEKNSNPNSKRSARGFDVVD 109
AtPrx72    VAKAFEHDPMPASLIRLHFHCFVQGCDAASILLDSSGTIISEKRSNPNSRSARGFELIE 112
          : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

```

                                H C                                H D
ZePrx      AAKAAVERVCPGVVSCADILAVAARDASVAVGGPSSWTVRGLGRRDSTTSNAAQAAT-DLPR 166
AtPrx4     QAKSAVESVCPGVVSCADIIAVAARDASEYVGGPSSRYDVKVGRDRSTNAFRAIADR-DLPN 159
AtPrx5     KAKSEVEKVCPIVSCADIIAVAARDASEYVGGPKWAVKVGRRDSTAAFKALANSSELPG 165
AtPrx52    NIKSAVEKACPGVVS CADILAAIARDSSVVALGGPSSNWNVKVGRRDARTASQAANG-NIPA 168
AtPrx68    AIKSRVERLCPGVVSCADILAITARDSVLLMGGPSSGWSVKLGRDRSITASFSTANSGLVLP 169
AtPrx67    KIKFKVEKMCPIVSCADILAITARDSVLLMGGPSSGWSVKLGRDRSTANFAAANGVIPP 160
AtPrx36    EIKSALENECPETVSCADLLALVARDSSIVICGGPSSWEVYLGRRDAREASLIGSME-NIPS 179
AtPrx14    EIKAALENECPTVSCADALTLAARDSSVLTGGPSSWTVPGLGRDRSATASRAKPNK-DLPE 173
AtPrx49    QIKAELEKQCPGTVSCADVLTLAARDSSVLTGGPSSWVVPGLGRDRSASLSQSNN-NIPA 168
AtPrx72    EIKHALEQECPETVSCADILALAARDSTVITGGPSSWEVPLGRDRDARGASLGSNN-DIPA 171
          * : * ** ***: * : : : : : : ** : * : * : * : : : . : *

```

```

                                H E                                H F                                H F'                                H F'
ZePrx      GNMVLSQLISNFANKGLNLTREMVALSGSHTLGQARCFRFRRIYNSTLR-----IEPNF 220
AtPrx4     FRASLNDLSEFLRKLGLNTRDLVALSGAHTLGQAQCLTFKGRLYDNSSD-----IDAGF 213
AtPrx5     FKDTLDQLSGLFSSKGLNTRDLVALSGAHTIGQSQCFLFRDRLYDNSSD-----IDAGF 219
AtPrx52    PTSSLSQLISSFSVAGLS TRDMVALSGAHTIGQSRCTNFRARIYNETN-----INAFA 221
AtPrx68    PTSTLDNLINLFRANGLSPRDMVALSGAHTIGQARCVTFRSRIYNSTN-----IDLSE 222
AtPrx67    PITTLNINLFRKAGLS TRDMVALSGAHTIGRAQCVTFRNRIYNASN-----IDTSE 213
AtPrx36    PESTLQITLTMFNQGLDITDLVALSGSHTIGNSRCIGFRQRLYNHTGNNDPDQTLNQDY 219
AtPrx14    PDNLFDTIFLRFSEGLNLTDLVALSGSHTIGFSRCTSFRQRLYNQSGSGSPDPTLEKSY 233
AtPrx49    PNNTQTILSKFNQGLDITDLVALSGSHTIGFSRCTSFRQRLYNQSGNGSPDPTLEQSF 228
AtPrx72    PNNTQTILTKFKRQGLDITDLVLSLGSHTIGNSRCTSFRQRLYNQSGNGKPDPTLSQYY 231
          : . : * ** . : : * * : * : * : * : * : * : * : : : . :

```

```

                                H F'                                H G                                H H                                H I
ZePrx      NRSLSQACPPPT--GNDATLRLPLDLVTPNSFDDNYRNLVTSRGLLISDQVLFN-A-DSTD 276
AtPrx4     SSTRKRRCPVN--GGDTTLAPLDQVTPNSFDDNYRNLVTSRGLLISDQVLFN-A-DSTD 270
AtPrx5     ASTRKRRCPTV--GGDGNLAAALDLVTPNSFDDNYRNLVTSRGLLISDQVLFN-A-DSTD 276
AtPrx52    ATTRQRTCPRASGSDGNLAPLDVTTAASFDDNYRNLVTSRGLLISDQVLFN-A-DSTD 279
AtPrx68    ALSRRRSCPAATGSDGNNAAALDLRTPKFDGSGYFQMLVNRHGLLTS DQVLFN-G-GSTD 280
AtPrx67    AISKRRCNCPATSGSDGNNKANLDVSPDRFDHGFIKQLLSKGLLTS DQVLFN-N-GPTD 271
AtPrx36    ASMLQQGCPIIS--GNDQNLFNLDVYTPKFDNYRNLVTSRGLLISDQVLFN-A-DSTD 296
AtPrx14    AAILRQRCPRS--GGDQILSVLDII SAASFDDNSYFKNLIENKGLLNSDQVLFSSN-EQSR 290
AtPrx49    AANLRQRCPKS--GGDQILSVLDII SAASFDDNSYFKNLIENKGLLNSDQVLFSSN-EKSR 285
AtPrx72    ATLLRQRCPRS--GGDQTLFFLDL FATPFKFDNHYFKNLIENKGLLNSDEILFTKN-KQSK 288
          : ** . . ** : . ** : : * *** : : *

```

```

                                H I                                H J
ZePrx      SIVTEYNNPATFAADFAAAMVKMSIEIGVVTGTSGLVIRTLGNGNPS--- 321
AtPrx4     SIVTEYSRNPFRFASDFSAAIKMGDIQTLTGSDGQIRRCISAVN--- 315
AtPrx5     GIVSEYSKNRSKFAADFATAMIKMGNIEPLTGSGNEIRKICISAVN--- 321
AtPrx52    SIVRGYSNPNPSSFNDFTAAMIKMGDISPLTGSSGEIRKICGRN--- 324
AtPrx68    SIVYSRSVQAFYRDFVAAMIKMGDISPLTGSGNQIRRCRRPN--- 325
AtPrx67    SLVIAYSHNLFYRDFARAMIKMGDISPLTGSGNQIRRCRRPN--- 316
AtPrx36    EMVQYAEENEGAFFEQFAKSMVKMGDISPLTGSDGEIRRCRRVNHV 344
AtPrx14    ELVKKYAEDQGEFFEQFAESMIKMGDISPLTGSGEIRKCRKINNS- 337
AtPrx49    ELVKKYAEDQGEFFEQFAESMIKMGDISPLTGSGEIRKCRKINS- 331
AtPrx72    ELVELYAEENEGAFFEQFAKSMVKMGDISPLTGAKGEIRRCRRVNHAY 336
          : * : . * * : : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Figura III.2. Alineamiento estructural y elementos de la estructura secundaria de las AtPrxs utilizando ZePrx como estructura modelo. Los elementos de la estructura secundaria de todas las peroxidases analizadas mostraron como característica común el posicionamiento invariable de las hélices A, B, C, D, E, F, F', H, I y J (sombreadas en morado), y las cuatro láminas β (sombreadas en azul). Cabe destacar la lámina β situada aguas arriba de la histidina proximal (sombreada en verde), la cual probablemente influye en el centro catalítico de las enzimas. Los sitios de N-glicosilación (sombreados en amarillo) están flanqueados por aminoácidos básicos (R y K, subrayado ondulado azul) y aminoácidos ácidos (E y D, subrayado ondulado rojo), confiriendo un potencial electrostático neto característico a esta zona de la proteína. Los polipéptidos predichos también contienen la firma del centro activo de las peroxidases (subrayado en negro), la firma del ligando hemo proximal de las peroxidases (subrayado en azul), 8 cisteínas conservadas (escrito en rojo), las cuales dan lugar probablemente a los cuatro puentes disulfuro característicos de la mayoría de las peroxidases vegetales de clase III, y dos sitios de unión del Ca^{2+} (escrito en azul), uno distal y otro proximal, característico de todas las peroxidases vegetales de clase III.

A partir de la información obtenida en las bases de datos sobre la secuencia del extremo N-terminal, es de esperar que todas las peroxidases de estudio sean procesadas co-traduccionalmente por escisión proteolítica. De hecho, se ha visto que estas peroxidases poseen un lugar de escisión en el péptido señal (figura III.2, escrito en verde), el cual coincide con los sitios de escisión habituales descritos para eucariotas (Nielsen *et al.*, 1997), y con la secuencia N-terminal de las AtPrxs maduras. La presencia de estos sitios de escisión en la proteína inmadura sugiere que poseen un péptido señal (un pro-péptido N-terminal) de unos 20-30 aminoácidos, cuya función es dirigir la cadena polipeptídica a la membrana del retículo endoplasmático (RE), de forma que las proteínas maduras contienen entre 296-313 aminoácidos.

Las nueve AtPrxs carecen del pro-péptido C-terminal susceptible de procesamiento proteolítico. De hecho, la proximidad a la que se encuentra la 8ª C del final del codón (de los 4 últimos aminoácidos) (figura III.2), sugiere que estas proteínas no tienen pro-péptido C-terminal que dirija a las proteínas hacia el transporte vacuolar, el cual, cuando está presente en las peroxidases de clase III (Rasmussen *et al.*, 1991; Welinder *et al.*, 2002), suele agregar una cola de 20-30 aminoácidos aguas abajo de la 8ª C conservada. Debido a que los polipéptidos (figura III.2) no tienen las colas KDEL, HDEL y DEL del RE para el transporte retrógrado, se puede afirmar que las proteínas siguen la ruta secretora por defecto, la cual termina en la pared celular.

De forma similar al extremo N-terminal, el C-terminal de una proteína puede ser un área activa de modificaciones post-traduccionales. Las peptidasas C-terminales dejan

expuestos residuos que pueden ser sustratos de un conjunto de transferasas que pueden miristoilar residuos de aminoácidos en el C-terminal de las proteínas. En el núcleo interno de todas las AtPrxs, se ha deducido más de un sitio crítico de N-miristoilación (tabla III.2). Debido a que estos sitios potenciales de N-miristoilación comienzan en posiciones aminoacídicas internas, no serían normalmente miristoiladas *in vivo* al menos que exista un procesamiento post-traducciona, que desenmascare a las glicinas N-terminal (Podell y Gribskov, 2004). Si estas AtPrxs se expresan notablemente en los elementos traqueales en diferenciación, estos sitios potenciales de N-miristoilación pueden ser esenciales durante el procesamiento de las AtPrxs por el proteosoma de la planta durante la muerte celular programada que caracteriza a los elementos traqueales en diferenciación (Fukuda, 1996).

Nombre	Sitio N-glicosilación	Sitio fosforilación Proteína Kinasa C	Sitio fosforilación Caseína Kinasa II	Sitio N-miristoilación	Sitio unión Ca ²⁺
<i>AtPrx4</i>	205-NSSD	36- TiR, 40- SiR, 186-STR, 223-TTR, 261-TQR	24-TFYD, 82-SERD, 115-SCAD, 163-SLND, 207-SDID, 301-TGSD	67- GCDASV, 112- GVVSCA, 191- GQAQCL, 225- GGD TTL, 254- G LLESD, 264- GTGAST	D62 y D69; D234 y D242
<i>AtPrx5</i>	211- NSSD y 285- NRSK	5- SiR, 34- ScR, 45-SvR, 87-SeR, 97-SvR, 178-SkK, 221-SiR, 222-TrK	29-TFYD, 83-STIE, 87-SERD, 109-SEVE, 120-SCAD, 213-SDID, 309-SNGE	72- GCDASI, 117- GIVSCA, 197-GSQCF, 231- GGDGNL, 234-GNLAAL, 260- GLIVTD, 270-GSGAST	D67 y D74; D240 y D248
<i>AtPrx52</i>	213- NETN	3- SNK, 101-SAR, 186-STR, 223-TTR, 261-TQR	113-SAVE, 124-SCAD, 186-STRD, 312-SSGE	76- GCDGSI, 121- GVVSCA, 200- GQSRCT, 234- GSGDGN, 264- GLLHSD, 276- GSTDSI	D71 y D78; D244 y D252
<i>AtPrx68</i>	99- NNSV y 214- NSTN	45- TvR, 101- SvR, 132-TaR, 146-SvK, 187-SpR, 207-TfR, 225-SrR, 320-ScR	113-SrvE, 124-ScaD, 132-TarD, 172-StiD, 187-SprD, 216- TniD	76- GCdaSI, 121- GVvsCA, 201-GQarCV, 235- GSgdNN, 265- GLItSD, 277- GStdSI	D71 y D78; D245 y D253
<i>AtPrx67</i>	205- NASN	92- SvR, 123- TaR, 137-SvK, 178-SiR, 198-TfR, 216-SkR, 253-SkK	15-SqsE, 115-ScaD, 123-TarD, 178-StrD, 207-SniD	67- GCdgSL, 112- GivsCA, 226-GSgdNK, 256- GLItSD	D62 y D69; D236 y D244
<i>AtPrx36</i>	224- NHTG	5- TvK, 102- SeK, 112-SaR	124-SalE, 135-ScaD, 250-SgnD, 265-TkfD, 283-SsdE, 327- TgtD, 329-TdgE	11- GIVISQ, 87- GCdaSV, 98-GTmeSE, 172- GSmeNI, 195- GLdlTD, 211- GNsrCI, 246-GCpiSG, 251- GNdqNL, 280- GLIsSD	D82 y D89; D260 y D268
<i>AtPrx14</i>	24- NASN, 191- NLTD, 218- NQSG, 249- NLSE	96-TeK, 106-SaR, 211- SiR	129-ScaD, 227-TtlE, 244-SggD, 251-SeID, 284-SsnE, 323-SsgE	30-GNkrNL, 81-GCdgSL, 92-GSivTE, 189-GLnlTD, 223-GSpdT, 245-GGdqNL, 274- GLlnSD	D76 y D83; D254 y D262
<i>AtPrx49</i>	170- NNTE, 213- NQSG	86- SgR, 91- TeK, 101-SaR, 206- SiR	124-ScaD, 239-SggD, 246-SvID, 279-SsnE, 318-SsgE	76-GCdgSL, 121-GTvsCA, 184-GLdlTD, 269-GLlnSD	D71 y D78; D249 y D257
<i>AtPrx72</i>	173- NNTE y 216- NQSG	94- SeK, 104- SaR, 209-SiR	127-ScaD, 165-SnnD, 242-SggD, 275-SsdE	79- GCdaSI, 90- GTiSE, 159-GTiSE, 203- GNsrCT, 243-GGdqTL, 272- GLIsSD	D74 y D81; D252 y D260

Tabla III.2. Sitios de N-glicosilación, sitios de fosforilación de la proteína kinasa C, sitios de fosforilación de la caseína kinasa II, sitios de N-miristoilación y sitios de unión del Ca²⁺ calculados en cada una de las AtPrx.

Las AtPrxs de estudio poseen ocho cisteínas (C) conservadas (figura III.2, tabla III.2). Las hemoproteínas, como las peroxidasas, que contienen C libres son susceptibles de inhibición por reactivos tiol (de Gara, 2004). Estas ocho C conservadas forman los

cuatro puentes disulfuro comunes a todas las peroxidasas vegetales de clase III (Welinder *et al.*, 2002) y que las distinguen de otras peroxidasas vegetales, tales como las ascorbato peroxidasas.

Con algunas excepciones (Gray *et al.*, 1996), la mayoría de las peroxidasas vegetales llevan uno o dos glicanos ligados al extremo N-terminal (Johansson *et al.*, 1992; Welinder *et al.*, 2002), siendo este también el caso de la AtPrxs, donde se pudo predecir uno o dos sitios de N-glicosilación (figura III.2 sombreado en amarillo, tabla III.2). Sin embargo, AtPrx14 mostró cuatro sitios de N-glicosilación. Los sitios de glicosilación que contienen prolina, o están seguidos de un residuo de prolina, no están glicosilados en las peroxidasas (Welinder *et al.*, 2002). Este es el caso de AtPrx 68, 14, 49 y 72 que poseen un sitio de N-glicosilación con una prolina adyacente, por lo que es posible que ese sitio no esté glicosilado.

Probablemente, los glicanos situados en la superficie de las AtPrxs cerca de la histidina proximal contribuyan a la atenuación de las interacciones de proteína/pared celular. Para determinar la localización espacial de los glicanos, se modeló la estructura 2D/3D de las AtPrxs utilizando el Fold and Function Assignment System (FFAS) (<http://ffas.burnham.org/>), empleando diferentes estructuras como modelo para cada AtPrx: la peroxidasa de cacahuete (1SCH) (Schuller *et al.*, 1996) para AtPrx 4, 5, 52, 68 y 67, la peroxidasa de soja (1FHF) (Henriksen *et al.*, 2001) para AtPrx 36 y 49, y la peroxidasa de *Arabidopsis* ATP A2 (1pa2) para AtPrx 14, 49 y 72 (Østergaard *et al.*, 2000). Una vez modeladas, los elementos estructurales secundarios de las AtPrxs (figura III.2 y III.3, tabla III.3) consistieron en 11 α -hélices y cuatro láminas β (Østergaard *et al.*, 2000).

Las características comunes entre ZePrx y las AtPrxs incluían el posicionamiento invariable de las hélices A, B, C, D, E, F, F', G, H, I y J (figura III.3). Al igual que en ZePrx, la hélice D' (hD') no aparece en las AtPrxs (figura III.3) ni en ninguna de las peroxidasas de tipo S basales descritas hasta ahora (Gómez Ros *et al.*, 2007a, b). Esto es importante debido a que la hélice D' se apoya en el grupo prostético hemo. La ausencia de la hélice D' en las peroxidasas de tipo S representa un factor de relajación en la hendidura del grupo hemo, lo que permite el acoplamiento de moléculas S, ya que la hélice D' corrige el motivo IPS, que determina la conformación y la hidrofobicidad del sitio de unión al sustrato (Østergaard *et al.*, 2000). Al igual que con la hélice D', la hélice F'' también está ausente en las AtPrxs. A pesar de su

nomenclatura, la hélice F'' se encuentra antes de la hélice F', ya que no aparece en todas las peroxidasas. La verdadera importancia de esta hélice en la catálisis no se conoce todavía, pero estas diferencias en la topología es probable que sean de importancia en la determinación de la dirección de ramificación en una reacción de polimerización y/o en la orientación de un sustrato polimérico (Henriksen *et al.*, 2001). Al igual que para la hélice D' y F'', debemos prestar especial atención a la lámina β situada aguas arriba de la histidina proximal en ZePrx y AtPrxs, la cual probablemente influye en el centro catalítico de las enzimas, aunque su importancia real en la catálisis se debe confirmar mediante datos cristalográficos y de mutagénesis dirigida (Ros Barceló *et al.*, 2007).

AtPrx	Hélice A	Hélice B	Hélice C	Hélice D	Hélice E	Hélice F	Hélice F'	Hélice G	Hélice H	Hélice I	Hélice J	Láminas β
4	Q31-R47	A53-D62	F96-V109	C116-V131	L164-K174	T178-S185	A211-R219	N243-Q251	D259-G264	S268-R278	P280-D296	R135-K139, S185-G186, L230-P232, Q306-R309
5	N37-R52	A58-D67	F101-V114	C121-V136	L170-K180	T184-L190	A217-R226	N249-Q257	D265-S271	S274-K284	R286-N302	K140-V143, S191-G192, L236-A238, E312-K315
52	P40-S56	A62-D71	F105-A118	C125-L140	L173-V183	T187-L193	A219-T228	N253-T261	D269-N274	S277-N287	P289-D305	N144-V147, S194-G195, L240-P242, E315-K318
68	S41-K56	A62-D71	Y105-L118	C125-M140	L174-N184	P188-L194	L220-S229	G254-N262	D270-N275	S278-R288	V290-D306	G144-V147, S194-G195, A241-I243, Q316-R319
67	P31-R47	A53-D62	F96-M109	C116-L131	L165-Q175	T179-L185	T211-N220	H245-S253	D261-N266	P269-H279	L281-D297	G135-V138, S186-G187, K232-N234, Q307-Q310
36	P51-N67	A73-D82	F116-E129	C136-C151	L184-Q194	L198-L204	Q237-Q245	N269-N277	D285-T290	I293-E304	E306-N322	S155-V158, L205-G206, L256-N258, E332-R335
14	P45-R61	A67-D76	F110-E123	C130-T145	F178-E188	L192-L198	K231-R240	N263-E271	D279-F283	E287-E298	Q300-K316	S149-P153, S199-G200, L250-E252, E326-K329
49	Q41-R56	A62-D71	F105-Q118	C125-T140	F173-Q183	I187-L193	Q226-Q234	N258-E266	D274-S279	E282-E293	Q295-N311	S144-V147, S194-G195, L245-V247, E321-K324
72	P43-H59	A65-D74	F108-E121	C128-T143	F176-Q186	L190-L196	Q229-R238	N261-M269	D277-F281	K285-E296	Q298-N314	S147-V150, S197-G198, L248-F250, E324-R327

Tabla III.3. Distribución de las α -hélices y láminas β en la secuencia de aminoácidos de las AtPrxs.

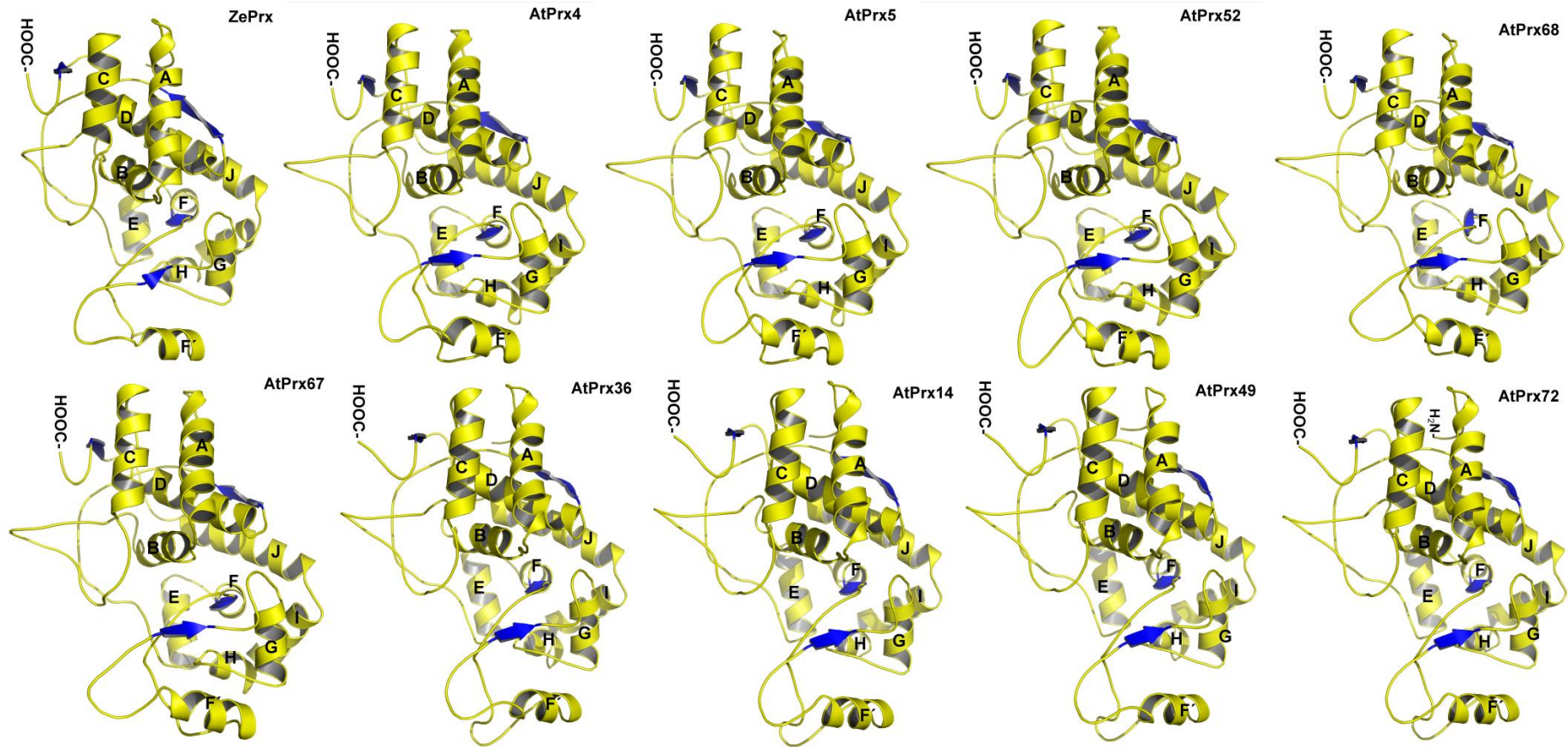


Figura III.3. Comparación de la estructura 3D predicha de las AtPrxs implicadas en lignificación. Todas las peroxididas muestran como característica común el posicionamiento invariable de las hélices A, B, C, D, E, F, F', G, H, I y J (en amarillo) y cuatro láminas β (en azul). La ausencia de la hélice D' (hD') en las peroxididas de tipo S representa un factor de relajación en la hendidura del grupo hemo, lo que permite el acoplamiento de moléculas S. Las peroxididas se modelaron utilizando el FFAS (<http://ffas.burnham.org/>), sobre la base de coordenadas de estructuras conocidas disponibles en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Tomado de Herrero *et al.* (2013a).

III.2.3. Interacciones proteína/pared celular y localización final (compartimentación)

Salvo excepciones, la mayoría de las peroxidasas vegetales llevan uno o dos glicanos unidos al sitio de N-glicosilación que pueden participar, junto con las propiedades de carga superficial, en el reconocimiento de proteínas y/o en las interacciones proteína/pared celular que determinan el tráfico celular de las proteínas y su localización final, lo que se denomina compartimentación.

Los sitios de N-glicosilación (205-NSSD) en AtPrx4, (211-NSSD) en AtPrx5, (213-NETN) en AtPrx52, (214-NSTN) en AtPrx68, (205-NASN) en AtPrx67 (224-NHTG) en AtPrx36, (218-NQSG) en AtPrx14, (213-NQSG) en AtPrx49 y (216-NQSG) en AtPrx72 se encuentran en una región inmediatamente aguas arriba del bucle de la hélice F' (figura III.2). Debido a que este glicano unido al sitio de N-glicosilación está cerca de la histidina proximal (figura III.2), esta glicosilación probablemente afecta a la dinámica de la reacción; dato que se ve reforzado por las propiedades catalíticas diferenciales de ZePrx (Gabaldón *et al.*, 2006). Además, puesto que la hélice F' se encuentra en la región superficial de las AtPrxs (Østergaard *et al.*, 2000), y por analogía a la región superficial de ZePrx (Gabaldón *et al.*, 2007), también es probable que los glicanos unidos a los sitio de N-glicosilación que se mencionaron anteriormente, participen en el reconocimiento de proteínas y/o en interacciones de membrana (proteína/pared celular) que determinan el tráfico celular de las AtPrxs, y su localización final (compartimentación).

Las singulares propiedades de superficie de las AtPrxs podrían determinar la naturaleza de estas interacciones. En AtPrx 4, 5, 52, 68, 67, 49 y 72, la proteína madura tiene un carácter fuertemente básico, mientras que en AtPrx36 y AtPrx14 es de carácter fuertemente ácido (ver pI en la tabla III.1). Después de la corrección del pI ($\Delta pI \sim 2,0$) para los dos iones de calcio y el hemo (Welinder *et al.*, 2002), el pI teórico para cada AtPrx es mucho más básico que el valor experimental determinado previamente (López-Serrano *et al.*, 2004).

Las características de carga superficial son aún más evidentes cuando se calcula la carga de la superficie molecular de las AtPrxs utilizando interacciones simples de Coulomb (figura III.4). El cartografiado del potencial electrostático demostró una característica distribución irregular de cargas en la superficie de todas las AtPrxs con un

predominio casi total de cargas netas de superficie positivas (figura. III.4, sombreado en azul), excepto en AtPrx 36 y 14. Sin embargo, el patrón de sombreado de la superficie de AtPrx 4, 5, 52, 49 y 72 no es proporcional a la composición de aminoácidos ácidos/básicos.

De hecho, a un pH de 7,0 y excluyendo los dos H, AtPrx 4, 5, 52, 49 y 72 presentan una diferencia pequeña entre los aminoácidos cargados positivamente y los aminoácidos cargados negativamente. El mapa del potencial electrostático (figura III.4) demostró que en la superficie de la proteína los aminoácidos cargados negativamente de estas cinco AtPrxs estaban en su mayoría recubiertos por amino ácidos cargados positivamente, lo que resulta en un inusual patrón de carga electrostática superficial neta positivo.

Esta inusual carga superficial debe tenerse en cuenta pues tiene un significado biológico, ya que estas propiedades de superficie singulares de las AtPrxs son esenciales en las interacciones proteína/pared celular.

Sin embargo, debido a su alto punto isoeléctrico (tabla III.1) y a las propiedades de carga superficial (figura III.4), se podría esperar que las AtPrxs (excepto AtPrx36 y 14) estén unidas firmemente a la matriz péctica de la pared celular primaria (Ferrer *et al.*, 1992). Las interacciones entre la proteína básica y la matriz péctica pueden ser atenuadas por el recubrimiento con glicanos, siendo el mejor ejemplo de esto la extensina (Cassab y Varner, 1988). De esta manera, los glicanos de las AtPrxs podrían reducir las interacciones electrostáticas con las pectinas, permitiendo que las AtPrxs puedan moverse libremente en la matriz de la pared celular y alcanzar la pared celular secundaria, donde después de comenzar la formación de la pared celular primaria, inician la deposición de lignina (Smith *et al.*, 1994).

Para apoyar esta conclusión, hay que destacar que los sitios de N-glicosilación descritos anteriormente para cada AtPrx se encuentran en una zona de superficie con un alto predominio de carga superficial neta +4,0 C (figura III.4), provocado por la presencia de un mayor número de aminoácidos básicos (figura III.2, K y R, subrayado ondulado de color azul) que de aminoácidos ácidos (figure III.2, E y D, subrayado ondulado de color rojo), constituyendo estas zonas el mejor dominio de superficie de las AtPrxs para las interacciones con pectinas (figura III.4). Sin duda, la ubicación de los glicanos en esta zona de carga neta positiva debería atenuar las interacciones

electrostáticas de las AtPrxs con las pectinas. En este punto, es interesante recordar que las AtPrxs no contienen el *clúster* de cuatro residuos de arginina (R117, R262, R268 y R271) responsables de las interacciones con pectinas (Carpin *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, AtPrx 36 y 14 tienen propiedades peculiares de superficie, con una carga superficial predominantemente de -4,0 C (figura III.4, sombreada en rojo), haciendo que su ubicación sea muy diferente a la de ZePrx y siendo este un factor determinante para descartarlas como peroxidasas involucradas en el último paso de la biosíntesis de ligninas.

A la vista de los estudios realizados y de los resultados obtenidos, AtPrx 4, 5, 52, 49 y 72 fueron las peroxidasas con el patrón de carga de superficie más parecido al de ZePrx, y esto, junto con sus características de estructura 3D descritas anteriormente, las hacen ser las candidatas mejor posicionadas hasta el momento.

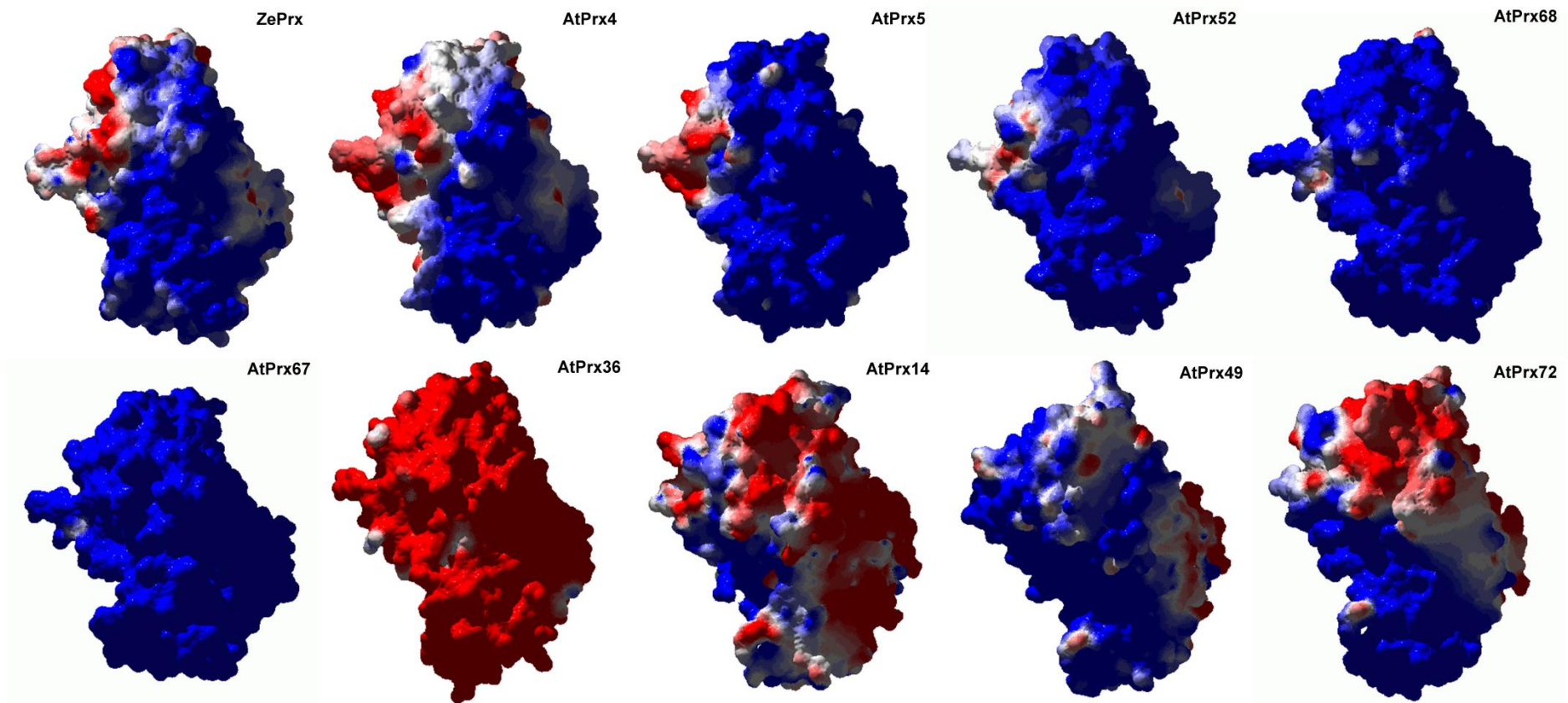


Figura III.4. Estructura de la superficie y mapeo del potencial electrostático de las AtPrxs de acuerdo con la estructura 3D predicha (ver figura. III.3). Las cargas superficiales se calcularon utilizando interacciones simples de Coulomb. La proteína se considera a pH 7,0, con un estado de protonación por defecto para todos los residuos. Sólo los residuos cargados (R, K, E y D) se tuvieron en cuenta y las cargas se encuentran en las correspondientes posiciones de los átomos (sin H). Las cargas superficiales netas de las imágenes oscilaron entre -4,0 C (rojo) a +4,0 C (azul). Los potenciales electrostáticos superficiales fueron asignados mediante el método de cálculo de Coulomb, suponiendo una constante dieléctrica (disolvente) de 80,000. Tomado de Herrero *et al.* (2013a).

III.2.4. mRNA, transcritos de AtPrx

La eficiencia de la traducción de un mRNA eucariótico está en gran medida determinada por la longitud y estructura secundaria de la región 5'-UTR (Kozak, 1991a). Los mRNAs eucarióticos poseen 5'-UTRs cuya longitud puede ser desde tres hasta varios cientos de nucleótidos (nt) con una longitud media de aproximadamente 90 nt (Kozak, 1991b). Parece ser que un 5'-UTR moderadamente largo (> 20 nt) y no estructurado, es necesario y suficiente para un inicio eficaz de la traducción, mientras que uno fuertemente estructurado es un obstáculo importante para la exploración que hace la subunidad 40S ribosomal para el inicio de la traducción (Kozak, 1991a). Es importante destacar que AtPrx 5 y 14 no tienen UTRs, lo que podría explicar su alta inestabilidad, que eventualmente podría conducir a que no se expresen (Valério *et al.*, 2004). Por esta razón, AtPrx 5 y 14 pueden ser descartadas como peroxidasas que participan en la lignificación.

Se sabe que la traducción es inhibida por una estructura de tallo y bucle (figura III.5) del 5'-UTR con una energía libre de -50 o -60 kcal/mol. Sin embargo, este no fue el caso de nuestras peroxidasas, donde la energía más baja que se encontró fue de -11,50 kcal/mol en AtPrx67 (figura III.5, anexo 1). Además, una purina, preferiblemente A, en la posición -3 y una G en la posición +4 del codón AUG tiene fuertes efectos en la modulación de la traducción, de al menos 10 veces mayor (Kozak, 1991a). Este es el caso de AtPrx 5, 52, 68, 14, 49 y 72, donde es de esperar una mejor traducción respecto al resto de peroxidasas de estudio.

También es de esperar que la traducción de los transcritos de AtPrx pueda ser desencadenada por el estrés. Los mRNA que codifican proteínas inducidas por estrés, como es el caso de algunas peroxidasas (Welinder *et al.*, 2002), se caracterizan por mostrar 5'-UTRs que contienen un 40-71% de adenina (Østergaard *et al.*, 1998). La calidad de estos 5'-UTRs ricos en A puede afectar a la transcripción, traducción, y/o a la estabilidad del mRNA. Por ejemplo, se ha encontrado que más del 80% de los 5'-UTRs de las “*heat shock proteins*” (hsp, proteínas de choque térmico) de invertebrados y plantas son ricos en AU (Østergaard *et al.*, 1998). Por lo tanto un 5'-UTR de una peroxidasa que sea rico en A, presumiblemente, tiene muy poco potencial de formar estructuras secundarias estables y por lo tanto la tasa de renovación de la proteína puede verse afectada, siendo mayor para aquellas proteínas con una alta tasa de decaimiento.

Sin embargo, este no fue el caso de AtPrx 4 (39%), 52 (38%) y 49 (27%) (anexo 1), ya que sus transcritos tienen un contenido de adenina en su 5'-UTR inferior al 40%. En cambio, AtPrx72 tiene un porcentaje superior al 40% (47%, anexo 1). No obstante, los porcentajes de A no parecen ser muy limitantes en nuestra búsqueda de homólogos debido a que ZePrx contiene tan sólo un 27%.

Sin embargo, los niveles de expresión génica no sólo están mediados por la tasa de traducción, sino también por las tasas de decaimiento del mRNA. Debido a que los niveles de mRNA en estado estacionario vienen determinados por la conjunción de la tasa de síntesis y la de decaimiento, elevadas tasas de decaimiento llevarían a una reducción en la expresión, si la síntesis se mantiene constante. Se sabe que varios factores contribuyen a la longevidad/vida media del mRNA (Narsai *et al.*, 2007). Entre estos factores se incluyen determinantes específicos, tales como los AREs (de sus siglas en inglés: *AU-rich regions*) que confieren corta longevidad y los DST (de sus siglas en inglés: *downstream sequence*) (Newman *et al.*, 1993; Narsai *et al.*, 2007).

Para caracterizar mejor los transcritos de las AtPrx, se estudió su longevidad/vida media. Los transcritos con vidas medias cortas han sido previamente documentados en *Arabidopsis* y en otras plantas de estudio (Ohmetakagi *et al.*, 1993; Narsai *et al.*, 2007), y sus 5'-UTR/ORF/3'-UTRs contienen elementos que confieren corta longevidad, entre los cuales, los más ampliamente estudiados son los AREs. Estos se encuentran generalmente en la región 3'-UTR, pero también en la región codificante y en el 5'-UTR en algunos de los transcritos más inestables de plantas descritos en la bibliografía (Narsai *et al.*, 2007). Estos resultados están la línea de los estudios en seres humanos, los cuales han revelado que la proteína ELAV RNA factor de estabilidad Hur, que se sabe que se une elementos ricos en AU dentro del 3'-UTR, también era capaz de unirse al 5'-UTR del factor de crecimiento insulínico, lo que ilustra cómo algunos factores *trans* pueden unirse a elementos tanto en el 3' como 5'-UTR (Peng *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2005).

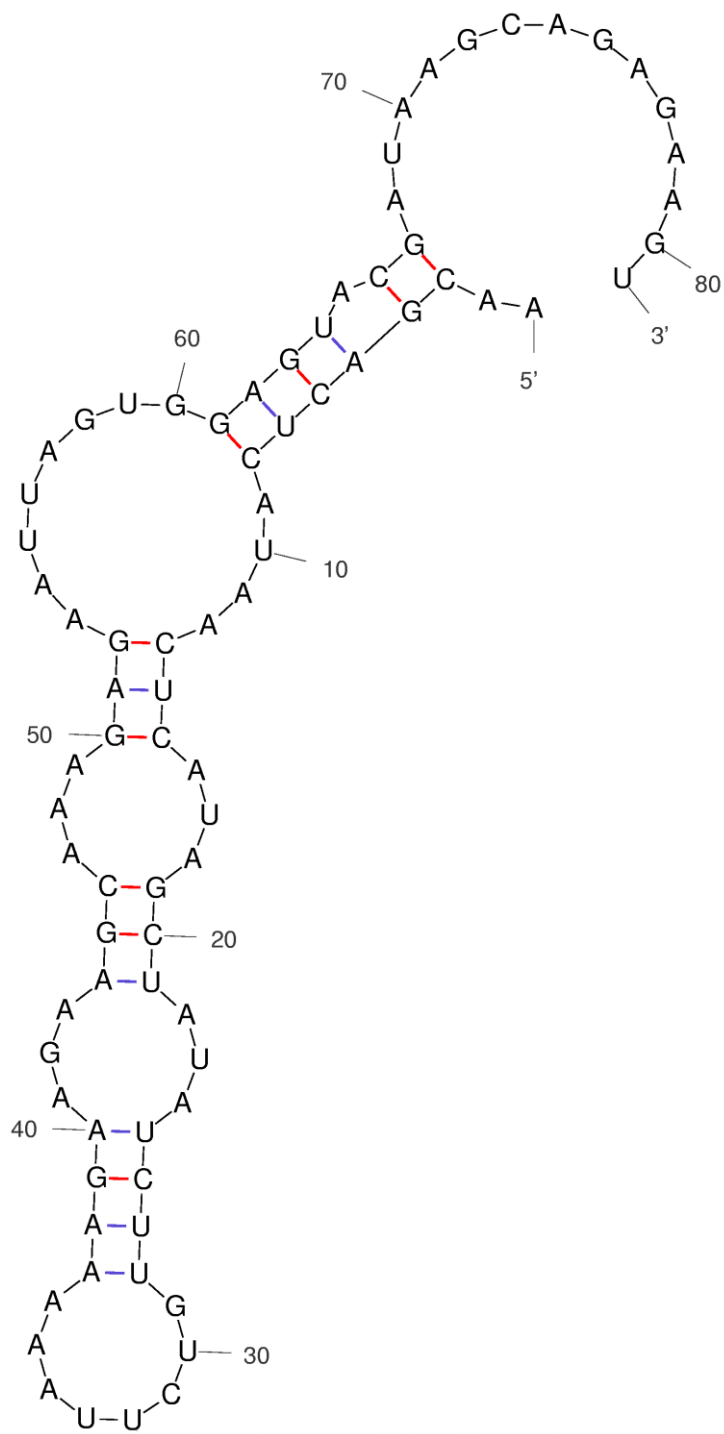


Figura III.5. Estructura de tallo y bucle del 5'-UTR de AtPrx67. $\Delta G = -11.50$. Ver anexo 1.

En este punto cabe mencionar que los transcritos de las AtPrx poseen elementos de corta longevidad tales como las cajas AAUUUU, UUUUUG, UUUUUU, AGUUUU, UUUUGU, AUUUUG, AUUUUU, GUUUUG, GUUUUU y UAGGAU (tabla III.4). El mRNA de AtPrx4 contiene al menos 13 regiones ricas en AU (AREs), tres situadas en la 3'-UTR (tabla III.4, escrito en negrita), y diez en el ORF (tabla III.4). El mRNA de AtPrx5 contiene al menos 16 AREs, ubicados todos en el ORF ya que no posee UTRs (tabla III.4). AtPrx52 contiene al menos 30 AREs, cinco localizados en el 3'-UTR (tabla III.4, escrito en negrita), y 25 en el ORF (tabla III.4). AtPrx68 contiene al menos 23 AREs, dos situados en el 3'-UTR (tabla III.4, escrito en negrita) y 21 en el ORF (tabla III.4). AtPrx67 contiene al menos 18 AREs, tres situados en el 3'-UTR (tabla III.4, escrito en negrita) y 15 en el ORF (tabla III.4). AtPrx36 contiene al menos 10 AREs, seis situados en el 3'-UTR (tabla III.4, escrito en negrita) y cuatro en el ORF (tabla III.4). AtPrx14 contienen al menos cinco AREs, ubicados todos en la ORF porque no tiene UTRs al igual que AtPrx5 (tabla III.4). AtPrx49 contiene al menos 11 AREs, cinco localizados en el 3'-UTR (tabla III.4, escrito en negrita) y seis en el ORF (tabla III.4). Por último, el mRNA de AtPrx72 contiene al menos ocho AREs, tres situados en el 3'-UTR (tabla III.4, escrito en negrita) y cinco en el ORF (tabla III.4).

Los resultados sugirieron que los mRNA de las AtPrx son candidatos a mostrar una corta longevidad. Se cree que todos los AREs funcionales participan en la desadenilación como primer paso en el decaimiento del mRNA, aunque diferentes clases de AREs exhiben diferentes cinéticas de reacción (Narsai *et al.*, 2007).

Además de los AREs, otro elemento que confiere corta longevidad al mRNA, y que ha sido estudiado en detalle, es el DST (Newman *et al.*, 1993; Pérez-Amador *et al.*, 2001). El elemento DST fue identificado por primera vez como una secuencia altamente conservada en el 3'-UTR de los genes de vida corta SAUR en soja (McClure *et al.*, 1989). Estos genes codifican transcritos atípicos cuya vida media se ha estimado del orden de 10-15 min. El DST prototipo del gen SAUR15A de soja tiene aproximadamente 45 pb de largo, y se compone de tres subdominios altamente conservados separados por dos regiones variables (Newman *et al.*, 1993). Estudios de mutagénesis han demostrado que las regiones ATAGAT y GTA dentro de dos de los subdominios conservados, son necesarias para la función de conferir una corta longevidad (Sullivan y Green, 1996). Al igual que con los AREs, sólo el mRNA de AtPrx5 contiene un elemento DST de 37 pb, que es análogo a los elementos DST

encontrados en los transcritos SAUR (figura III.5). Los genes SAUR se caracterizan por su sensibilidad a las auxinas (McClure *et al.*, 1989), y, aunque la función de las proteínas SAUR es aún desconocida, la expresión temporal y espacial de los genes SAUR se correlaciona con la elongación celular inducida por auxinas (McClure *et al.*, 1989). La ausencia de UTRs, así como la presencia de AREs y un elemento DST sugiere que el transcrito de AtPrx5 es altamente inestable, lo que podría conducir a que no se esté expresando.

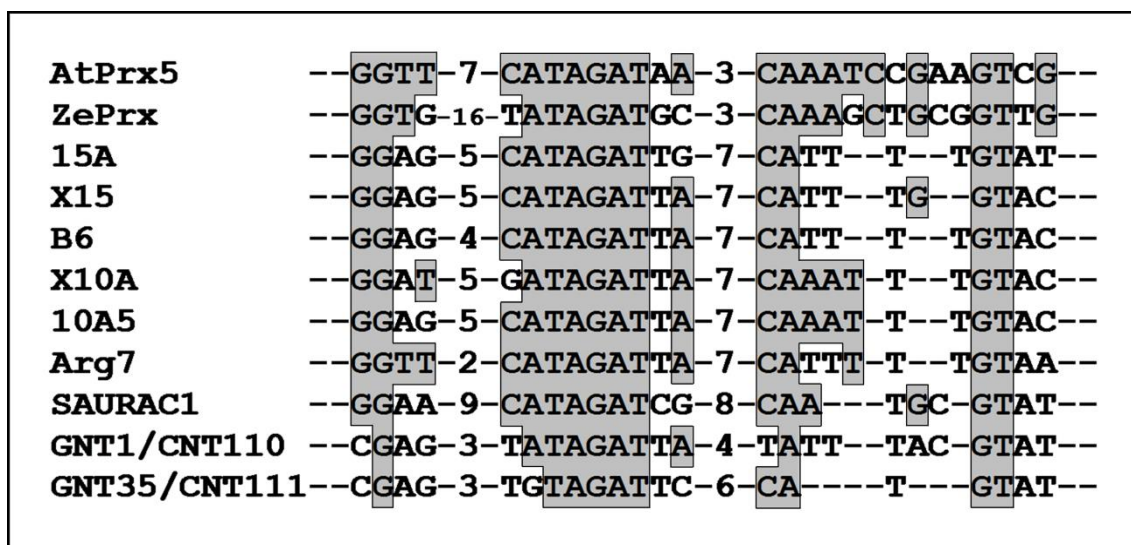


Figura III.5. Localización y estructura del elemento DST en el transcrito de AtPrx5. El elemento DST en AtPrx5 fue identificado mediante la alineación del mRNA de AtPrx5 con las secuencias de los DST identificados en siete genes SAUR y en dos transcritos inducibles por auxinas. Los DST consisten en tres regiones altamente conservadas separadas por dos regiones variables. Dentro de las regiones consenso, las bases invariables han sido delimitadas y sombreadas en gris. Números de acceso para los genes de plantas que contienen secuencias de DST: 15A, *Glycine max* (S44172); X15, *Glycine max* (S44173); 6B, *Glycine max* (S44175); X10A, *Glycine max* (S44176); 10A5, *Glycine max* (S44177); Arg7, *Vigna radiata* (D14414); SAURAC1, *Arabidopsis thaliana* (S70188); GNT1/CNT110, *Nicotiana tabacum* (X56268); GNT35/CNT111, *Nicotiana tabacum* (X56269). Tomada de Herrero *et al.*, 2013a.

Regiones ricas en AU										
AtPrx	AAUUUU	UUUUUG	UUUUUU	AGUUUU	UUUUGU	AUUUUG	AUUUUU	GUUUUG	GUUUUU	UAGGAU
4	377, 704	1459	283, 289, 295	1200	1202, 1460	705	282, 1458	1201	-	-
5	-	789	784	217, 281, 782, 1129	204, 283, 1131	-	247	203, 282, 384, 1130	218, 783	-
52	923	249, 1082, 1132, 1268, 1797	231, 248, 1081, 1119, 1160, 1792	229	250, 10839, 1098, 1133, 1275, 1798	554, 1864	1131, 1188, 1267	1274	230, 1080, 1118, 1159, 1791	-
68	702, 843, 852, 996	264, 971	242, 248, 262, 748, 966, 1656	718	265, 1011, 1521	997, 1520	747	1010	241, 261, 1655	-
67	838	336, 840, 847	208, 335, 846, 1552	1644	189, 841, 848	803	839	188	845, 852, 1551	-
36	-	1523	1515, 1521	131	608, 1524	-	1564, 1635	296	-	572
14	712	-	-	-	595	797	254	594	-	-
49	-	562, 1167	1166, 1350	1164, 1374	1341	-	-	1340	561, 1165, 1349	-
72	279	57	-	107, 1321	58, 1386	1385	298	-	-	-

Tabla III.4. Regiones ricas en AU ubicadas en los transcritos de las AtPrx. La presencia de motivos ricos en AU se asocia con transcritos altamente inestables. Se realizó una búsqueda manual para identificar el contenido de AU en el 3'-UTR (escrito en negrita), ORF (escrito normal) y 5'-UTR (ninguno). Las posiciones están contadas desde el inicio de la traducción.

Además de la presencia de varios elementos que confieren vida corta al mRNA, algunos transcritos de AtPrx mostraron varios elementos no específicos que confieren longevidad al transcrito, tales como los motivos de poli-adenilación AAUUAAA, AAUAAU y AAUAAA (tabla III.5) y la posesión de al menos un intrón (anexo 1). El motivo de poliadenilación AAUAAA (Keller, 1995) suele ser significativo entre los transcritos de bajo decaimiento, y de acuerdo con Joshi (1987), el 34% de los 3'-UTRs de *Arabidopsis* contenían la señal de poliadenilación altamente conservada AAUAAA, conocida a partir de mamíferos (Wickens, 1990), que se encuentra 20-25 nt aguas arriba del sitio de poliadenilación.

Señal Poly(A)			
AtPrx	AAUUAAA	AAUAAU	AAUAAA
4	1363	1523	1526
5	-	-	-
52	-	-	1745
68	-	1636	1709
67	-	1529	1615
36	-	-	-
14	-	-	-
49	-	-	-
72	-	-	-

Tabla III.5. Señales de poliadenilación localizadas en el 3'-UTR de las AtPrx. Se hizo una búsqueda manual para identificar la existencia de las tres principales señales de poliadenilación descritas en la bibliografía, POLASIG1 (AAUAAA), POLASIG2 (AAUAAU) y POLASIG3 (AAUAAA). Las posiciones están contadas desde el inicio de la traducción.

Las señales de poliadenilación son muy importantes para exportar fuera del núcleo, para la traducción y para la estabilidad de los mRNAs. Se buscó la señal de poliadenilación AAUAAA y otras típicas de plantas (véase la tabla III.5) en los 3'-UTRs de las AtPrxS y sólo AtPrx 4, 52, 67 y 68 tuvieron la secuencia AAUAAA al igual que ZePrx (tabla III.5). Dado que las colas de poli (A) estabilizan el mRNA, es plausible, y

los resultados así lo sugieren, que los genes que poseen el motivo AAUAAA tienden a producir transcritos más estables.

III.2.5. Regulación hormonal de las AtPrxs homólogas a ZePrx a partir del análisis *in silico* de la región promotora

Aunque las vías de biosíntesis de la pared secundaria se han caracterizado bioquímica y genéticamente con gran detalle, poco se sabe acerca de la señalización y de los reguladores transcripcionales responsables de la activación de la biosíntesis de la pared secundaria. Estudios recientes han demostrado un papel central para los mecanismos del desarrollo que implican fitohormonas tales como auxinas, citoquininas y brasinoesteroides, que actúan por medio de una cascada de señalización de factores de transcripción de la familia NAC, MYB, AP2 (APETALA2), MADS y HD ZIP de clase III, que regulan el crecimiento secundario (Demura y Fukuda, 2007; Zhong *et al.*, 2008). La nueva información que se está obteniendo sobre la percepción y acción de fitohormonas, está empezando a aclarar los mecanismos por los cuales, las fitohormonas regulan el crecimiento secundario. Esta participación de múltiples fitohormonas durante el crecimiento secundario está apoyada por la expresión de genes involucrados en la síntesis de citoquininas y auxinas en los tejidos de *Arabidopsis* con crecimiento secundario (Zhao *et al.*, 2005).

Cuando se estudió la regulación hormonal de ZePrx (Gutiérrez *et al.*, 2009; López Núñez-Flores *et al.*, 2010), se encontró que esta peroxidasa es sensible a una gama de hormonas (auxinas, citoquininas, brasinoesteroides y giberelinas) que controlan la lignificación del xilema. De hecho, las auxinas y citoquininas inducen la actividad de ZePrx, de manera similar a la que inducen la diferenciación del xilema, mientras que los brasinoesteroides y el ácido giberélico reducen los niveles de ZePrx, de manera similar a la que se reduce el crecimiento secundario de plántulas de *Z. elegans* (Gutiérrez *et al.*, 2009; López Núñez-Flores *et al.*, 2010). Esta respuesta hormonal de ZePrx está apoyada por el análisis de su promotor, el cual contiene elementos *cis* que responden directamente a las auxinas, citoquininas, brasinoesteroides y giberelinas, así como elementos *cis* diana de un gran número de factores de transcripción, del tipo NAC, MYB, AP2, MADS y HD Zip de clase III, regulados positivamente durante la diferenciación del xilema inducida por auxinas y citoquininas (Gutiérrez *et al.*, 2009).

Por otra parte, moléculas de señalización tales como H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) y NO (óxido nítrico) juegan un papel importante en el proceso de lignificación de la pared celular del xilema. Contrariamente a lo que se esperaba inicialmente, las paredes celulares de los tejidos del xilema son estructuras dinámicas compuestas de polisacáridos, compuestos fenólicos (por ejemplo, ligninas), minerales y proteínas, que no sólo son importantes para el mantenimiento de la planta, sino también para responder a las señales endógenas y ambientales mediante la liberación de moléculas de señalización, tales como H₂O₂ (Gómez Ros *et al.*, 2006) y NO (Gabaldón *et al.*, 2005b), que pueden actuar siguiendo las vías autocrina y paracrina (Ros Barceló, 2005; Gómez Ros *et al.*, 2012). Por tanto, la producción de H₂O₂ en las células vasculares es un proceso del desarrollo fuertemente regulado que muestra un incremento al inicio de la lignificación de la pared celular del xilema (Gómez Ros *et al.*, 2012). En el caso del óxido nítrico (NO), es una molécula altamente reactiva y un importante mensajero biológico en plantas (Gómez Ros *et al.*, 2012), que es constitutivamente sintetizado por los tejidos vasculares (Gabaldón *et al.*, 2005b).

Tanto los radicales O₂^{•-}/H₂O₂ (Gómez Ros *et al.*, 2006) y NO (Gabaldón *et al.*, 2005b) no son sólo producidos por las células del xilema, sino que también son sus dianas. De todas las enzimas que se encuentran en las paredes celulares del xilema, las peroxidasas merecen una atención especial como dianas de H₂O₂ y NO, ya que el H₂O₂ es un activador, mientras que el NO es un inhibidor de la cinética de la enzima (Gómez Ros *et al.*, 2012). Los estudios previos con ZePrx han demostrado que esta peroxidasa es sensible a H₂O₂ y NO, una respuesta que se apoya en un análisis del promotor de ZePrx, el cual contiene elementos *cis* de respuesta a H₂O₂ y NO (Gómez Ros *et al.*, 2012).

Por tanto, continuando con el análisis desde la proteína hasta el gen en el estudio de las peroxidasas implicadas en lignificación, es importante el estudio de la regulación hormonal de estos genes mediante un análisis de su región promotora.

Se encontraron varias secuencias en el promotor aguas arriba del sitio principal del inicio de la transcripción en todas las AtPrx, tales como la caja TATA y CAAT, y las cajas TATA: TTATTT, TATATAA, TATTAAT y TATATATA, pero sólo AtPrx 4, 52, 68 y 67 tienen una secuencia adicional potenciadora de la transcripción: ATTTGCAT (y su reverso complementario, ATGCAAAT).

Se analizaron las secuencias del promotor de las AtPrx utilizando la base de datos PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>), una conocida colección de los elementos reguladores del promotor en plantas recogidos en la bibliografía (Higo *et al.*, 1999). Debido a que no todas las secuencias reguladoras conocidas se encuentran en la base de datos PLACE, se realizó también una búsqueda manual para identificar elementos *cis* adicionales. Los promotores de las AtPrxs demostraron contener una serie de elementos *cis* conocidos relacionados con la regulación por hormonas vegetales.

III.2.5.1 Respuesta de las AtPrxs a auxinas

Las células vasculares de plantas se originan a partir de células procambiales, las cuales son células madre vasculares. Estudios en cultivos celulares de *Z. elegans* y en mutantes de *A. thaliana* indican que las moléculas de señalización intercelular tales como auxinas, citoquininas y brasinosteroides regulan el mantenimiento o la diferenciación de las células procambiales a través de distintos mecanismos de expresión génica y de señales de transducción intracelular (Demura y Fukuda, 2007). No todas las células que se someten a auxinas se diferencian en células vasculares y por tanto, además de auxinas en sí, se necesita de la capacidad de percepción de auxinas para la formación de haces vasculares.

Muchos genes inducidos por auxinas están regulados por la interacción de dos clases de factores de transcripción génica, los ARFs (*auxin-response factors*) y los represores AUX/IAA (Lau *et al.*, 2008). Los ARFs se unen al elemento *cis* de respuesta a auxina (G/T)GTC(T/C)(T/C) que hay en los genes que responden a auxinas (Ulmasov *et al.*, 1997). Cuando las concentraciones de auxina se encuentran por debajo de un nivel umbral, los represores AUX/IAA se asocian con los activadores ARF y reprimen la expresión de estos genes. Por el contrario, altos niveles de auxina conducen a la destrucción de los represores AUX/IAA y a la activación de los genes (Lau *et al.*, 2008).

Mediante el uso de métodos *in silico*, se identificaron dos tipos de AuxREs en los promotores de AtPrxs. El primero de ellos, (G/T)GTC(T/C)(T/C) (ARFAT), fue encontrado en los promotores de AtPrx 52, 68, 67, 14, 49 y 72 junto con su elemento inverso, GAGAC (SURE), que se encontró en todos los promotores, excepto en los de las peroxidasas ácidas 36 y 14 (figura III.6).

Estas dos peroxidases fueron rechazadas previamente como peroxidases implicadas en la biosíntesis de la ligninas (Herrero *et al.*, 2013a). De hecho, AtPrx 14 y 36 tienen un bajo pI (tabla III.1) y unas propiedades de superficie peculiares con una carga superficial total predominantemente de -4.0C (figura III.4), haciendo que su ubicación sea muy diferente a la de ZePrx.

El segundo elemento *cis*, que consiste en la secuencia CATATG (CATATGMSAUR) (Xu *et al.*, 1997) y que caracteriza a los genes SAUR, se encontró sólo en dos promotores de AtPrx (5 y 52) (figura III.6). Como ya se ha explicado anteriormente, probablemente AtPrx5 es un gen de tipo SAUR debido a la presencia de un elemento DST de corta longevidad en su mRNA, una secuencia altamente conservada en los genes SAUR (Herrero *et al.*, 2013a). Sin embargo, la ausencia de UTRs, así como la presencia de AREs y del elemento DST, sugiere que el transcrito de AtPrx5 es altamente inestable, lo que podría conducir a no ser expresado (Herrero *et al.*, 2013a). Aunque AtPrx52 no tiene elemento DST, los resultados sugieren que AtPrx52 podría ser altamente sensible a las auxinas de la misma forma que ZePrx en las plantas de *Zinnia*, donde no sólo las auxinas inducen la actividad de la enzima, sino también tienen la capacidad para inducir el crecimiento secundario a una concentración dada (Gutiérrez *et al.*, 2009). Por lo tanto, AtPrx52 es la única de las 9 peroxidases estudiadas que cumple uno de los requisitos más restrictivos para su participación en la biosíntesis de ligninas de la misma forma que ocurre con ZePrx.

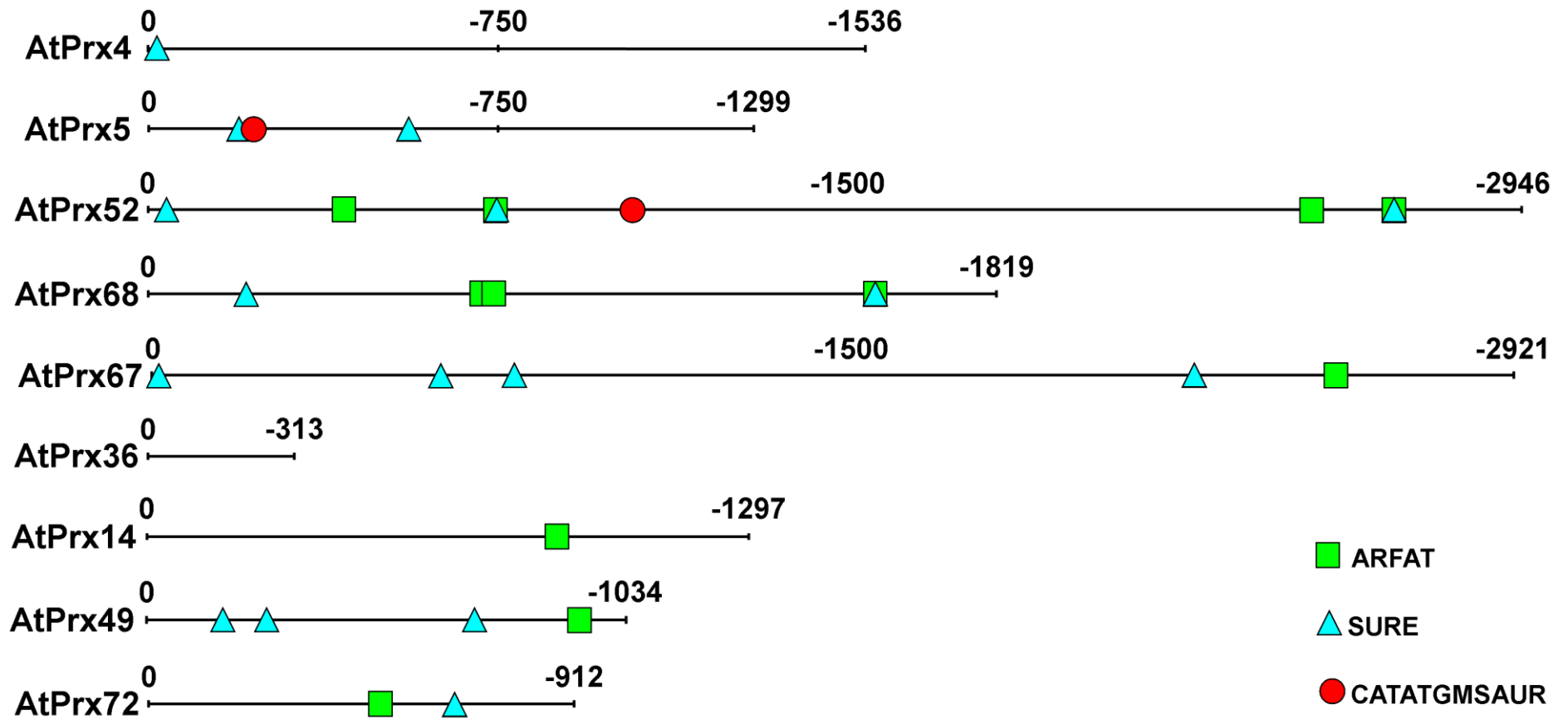


Figura III.6. Cartografía de los elementos *cis* de respuesta a auxinas (ARFAT, SURE y CATATGMSAUR) en los promotores de AtPrxs. La numeración se refiere al sitio de inicio de la transcripción respectivo.

III.2.5.2 Respuesta de las AtPrxs a citoquininas

Junto con auxinas, las citoquininas desempeñan un papel crucial en la formación y/o mantenimiento de las células procambiales (Gutiérrez *et al.*, 2009). El receptor de citoquinina CYTOKININRESPONSE1 (CRE1; también conocido como WOODENLEG [WOL] o ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE4 [AHK4]), codifica una histidina quinasa y se expresa preferentemente en las células procambiales (Hutchinson *et al.*, 2006). La citoquinina percibida por este receptor WOL/CRE1/AHK4 transmite una señal intracelular que está mediada por un mecanismo de tipo “*phosphorelay His-Asp*” (AHP) para factores de fosfotransferencia que contienen histidina, relacionados con las células procambiales, y luego a un elemento de unión ARR de respuesta a citoquinas de tipo B relacionado con células procambiales (Hutchinson *et al.*, 2006). Los ARRs de tipo B pueden funcionar como activadores transcripcionales de los genes relacionados con las células procambiales, incluyendo los genes de sus represores, los ARRs de tipo A (Sakai *et al.*, 2000).

Mediante el uso de métodos *in silico*, el elemento de unión ARR1 de respuesta a citoquinas, NGATT (ARR1AT) (Sakai *et al.*, 2000), se encontró en todos los promotores AtPrxs (figura III.7). Estos resultados sugieren que todas estas peroxidases también pueden ser sensibles a las citoquininas. Como en el caso de las auxinas en ZePrx, las citoquininas inducen la actividad del enzima y también tienen la capacidad de inducir el crecimiento vascular (Gutiérrez *et al.*, 2009).

Cabe destacar que la función de las citoquininas en las células procambiales podría requerir de auxinas. Por ejemplo, en *Z. elegans*, células del mesófilo de hojas jóvenes pueden ser inducidas a transdiferenciarse de forma sincronizada y en alta frecuencia en elementos traqueales en presencia de auxinas y citoquininas (Fukuda, 2004). Por lo tanto, en las células procambiales, la señalización coordinada por citoquininas y auxinas induce la expresión de genes que están involucrados en el mantenimiento de las actividades procambiales (Fukuda, 2004). De hecho, las interferencias entre auxinas y citoquininas se producen en el procambium o cambium vascular, mejorando el desarrollo vascular temprano (Demura y Fukuda, 2007). La presencia de represores en las rutas de señalización de auxinas y citoquininas podría suponer que la señalización de ambas estuviese coordinada temporalmente (Demura y Fukuda, 2007).

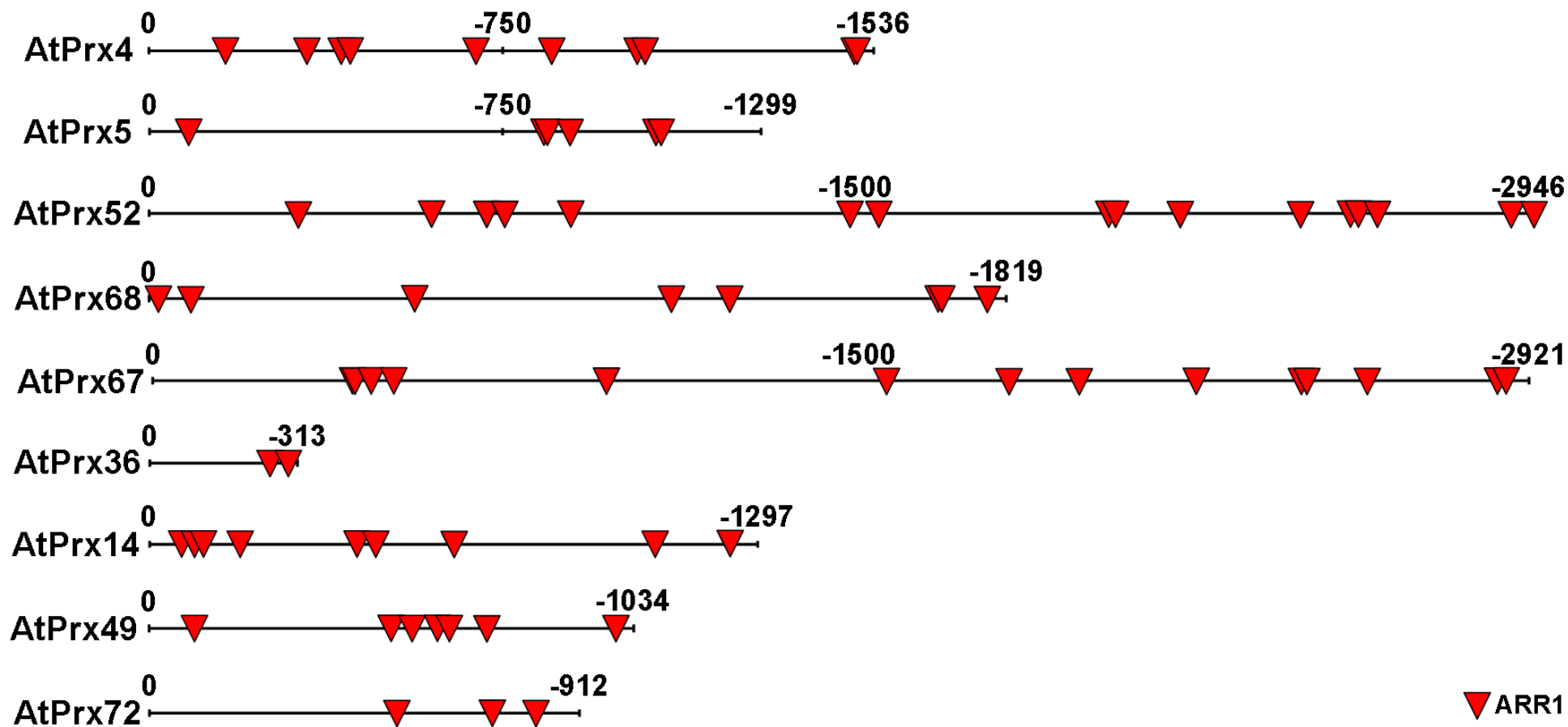


Figura III.7. Cartografía de los elementos *cis* de respuesta a citoquininas (ARR1) en los promotores de AtPrxs. La numeración se refiere al sitio de inicio de la transcripción respectivo.

El análisis de los promotores de las AtPrx demostró que algunos elementos de unión ARR1 (ARR1AT) están muy cerca (figura III.7) o superpuestos a algunos ARFAT y SAUR (figura III.6) en algunas AtPrxs, especialmente en el caso del promotor de AtPrx52 (figura III.8) donde su topografía argumenta en contra de la existencia de un posible efecto sinérgico (o aditivo) de estas hormonas en la expresión de AtPrx52.

Lo mismo ocurre con los promotores de AtPrx 67, 49 y 72, pero en menor medida. Por lo tanto, la unión de ARR1s y ARF a estas zonas de los promotores de las AtPrx puede ser alternativo pero no simultáneo, ya que la unión simultánea de ambos factores de transcripción ARR1 y ARF están probablemente sometidos a restricciones estéricas debido a la proximidad de los elementos *cis* (Gutiérrez *et al.*, 2009).

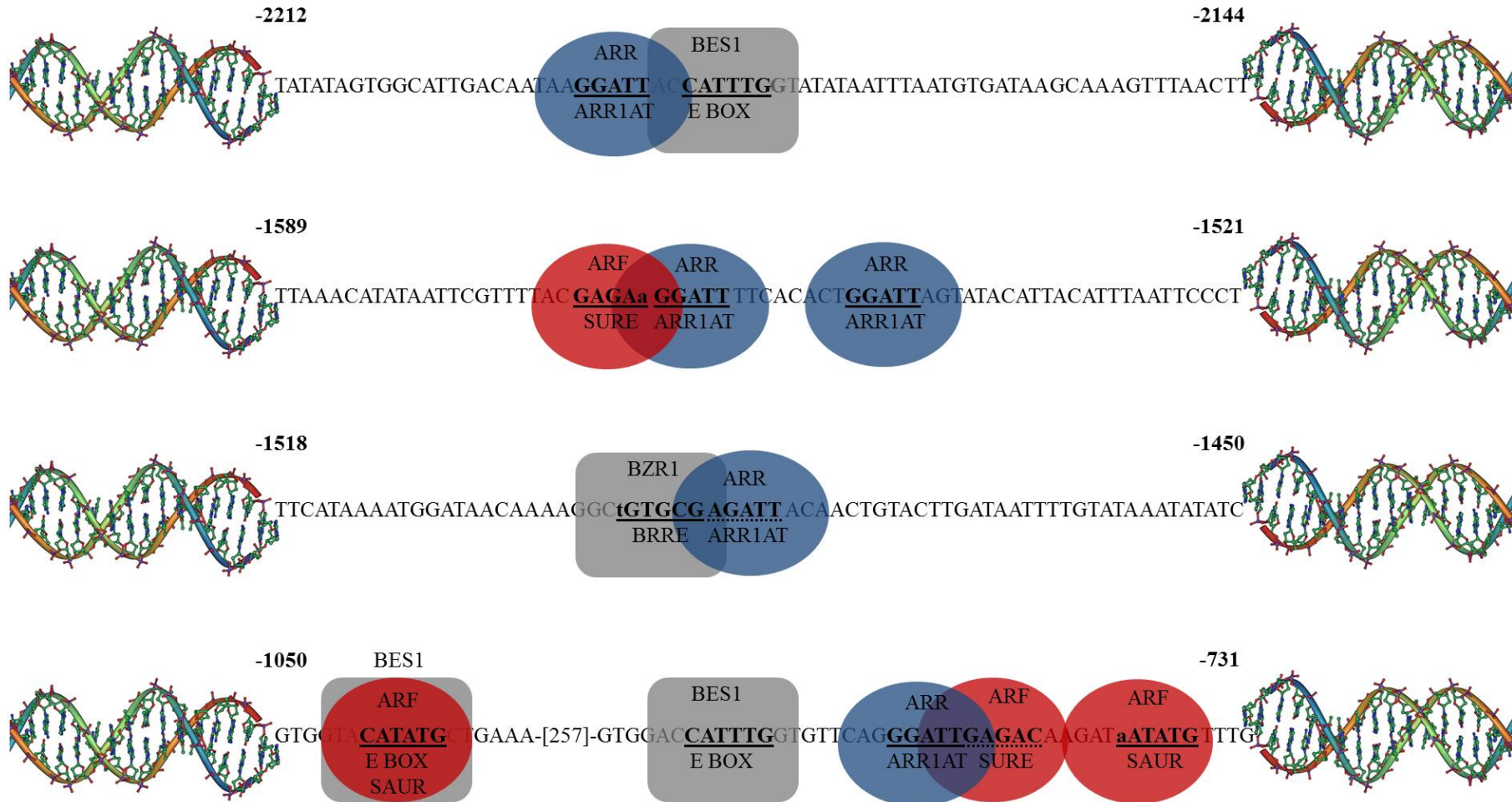


Figura III.8. Detalle de varias regiones del promotor de AtPrx52 donde se muestra la presencia de elementos *cis* de tipo ARR1AT, E box, BRRE, SURE y SAUR. Con ello se ilustra que la unión de dos factores de transcripción a estas zonas del promotor de AtPrx52 puede ser alternativa pero no simultánea, ya que, debido a la proximidad de los elementos *cis*, la unión simultánea de los dos factores de transcripción está probablemente sometida a restricciones estéricas. Con este razonamiento, se considera que una proteína globular de ~ 150 aminoácidos tiene un diámetro de ~ 3,5 nm, que la mayoría de las proteínas de unión de ácidos nucleicos interactúan de una manera localizada, y que una secuencia de 10 pb de la doble hélice de DNA lineal corresponde a un giro helicoidal de 3,4 nm.

III.2.5.3 Respuesta de las AtPrxs a brasinosteroides

Los brasinoesteroides participan en la regulación de la diferenciación vascular (Fukuda, 2004). En concreto, se sabe que los brasinoesteroides sintetizados endógenamente promueven la formación del xilema y suprimen la formación del floema (Fukuda, 2004). En los últimos años, se han identificado varios componentes de señalización de brasinoesteroides. Estos incluyen las quinasas de tipo receptor BRI1 y BAK1, BKI1 (inhibidor de quinasa 1 BRI1), la quinasa GSK3/SHAGGY BIN2 que regula negativamente la señalización de brasinosteroides, una fosfatasa localizada en el núcleo (BSU1), y los factores de transcripción BES1 y BZR1 que median importantes efectos de los brasinoesteroides. De acuerdo con el modelo actual de señalización de brasinoesteroides (Li y Jing, 2007), la unión de los brasinosteroides a BRI1 conduce a una rápida disociación de BRI1 de su inhibidor BKI1, seguido de la activación de BRI1 y BAK1. En las etapas posteriores se inhibe la actividad de fosforilación de BIN2, posiblemente a través de un mecanismo de reclutamiento de membrana. Como resultado, BES1 y BZR1 se desfosforilan rápidamente, muy probablemente por BSU1, lo que les permite combinarse con otros factores de transcripción que se unen a los promotores de los genes sensibles a brasinoesteroides. Estudios mediante el empleo de microarrays de DNA para identificar genes regulados por brasinoesteroides (Vert *et al.*, 2008), han demostrado que algunos de estos genes están regulados específicamente por brasinoesteroides, mientras que otros muestran una regulación adicional por auxinas.

Los brasinoesteroides se biosintetizan y secretan activamente en las células procambiales, pero por sí solos no funcionan como señal para el mantenimiento o la activación de las actividades procambiales (Fukuda, 2004). De hecho, el EB (20-epi-brassinólido, un brasinosteroides sintético) de forma aislada, inhibe el crecimiento secundario radial en plántulas de *Z. elegans*, de una manera similar a sus efectos sobre ZePrx (Gutiérrez *et al.*, 2009). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro análisis *in silico* de los promotores de las AtPrxs, que reveló la presencia de elementos de unión BZR1 (CGTG(T/C)G, BRRE) en al menos tres promotores de AtPrxs, específicamente en AtPrx 4, 52 y 68 (figura III.9, círculos en verde). También se encontraron elementos de unión BES1 (CANNTG, E-box) en todas las AtPrxs excepto en AtPrx49 (figura III.9, cuadrados en rojo). Cabe destacar que BZR1 se une directamente al elemento BRRE encontrado en el promotor de diversos genes sensibles a brasinoesteroides, desactivando la transcripción (Li y Jin, 2007). Además, en el

promotor de ZePrx, dos elementos de unión BZR1 están cerca de un elemento de unión ARR1 (Gutiérrez *et al.*, 2009), lo que sugiere una cierta interferencia entre las rutas de señalización de brasinoesteroides y citoquininas durante la regulación de ZePrx.

La misma situación se observó en la región promotora de AtPrx4 y AtPrx52 (figura III.8) entre ARR1 y BZR1 (BRRE) o BES1 (E-box). Esta topografía de elementos *cis* sugiere que la unión de ambos ARR1 y BZR1 (o ARR1 y BES1) a estas zonas de los promotores de ZePrx y AtPrx puede ser alternativa pero no simultánea, ya que la unión simultánea de los dos factores de transcripción esté probablemente sometida a restricciones estéricas debido a la proximidad de los elementos *cis*.

Sin embargo, la situación puede ser aún más complicada por el hecho de que las auxinas y los brasinoesteroides comparten vías de señalización, que convergen a nivel de las proteínas AUX/IAA (Vert *et al.*, 2008). Teniendo esto en cuenta, cabe destacar que el elemento CATATGMSAUR esté superpuesto a un BES1 en los promotores de AtPrx 5 y 52 (figura III.8).

Por contra, AtPrx49 es la única proteína que no presenta ningún elemento de respuesta a brasinoesteroides. A pesar de su alto grado de homología, esta característica puede ser motivo para descartar su implicación en procesos de lignificación al igual que ZePrx (Herrero *et al.*, 2014).

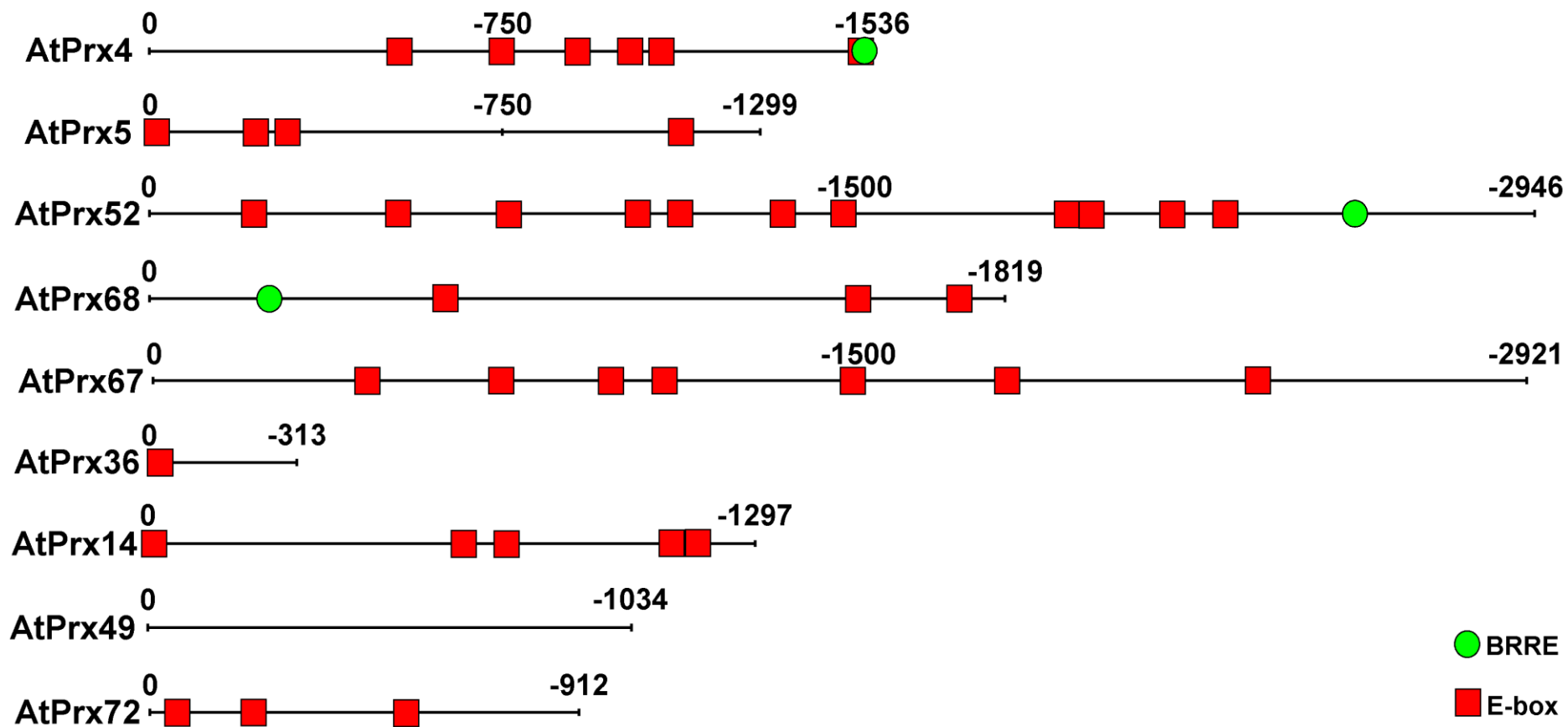


Figura III.9. Cartografía de los elementos *cis* de respuesta a brasinosteroides (BRRE y E-box) en los promotores de AtPrxs. La numeración se refiere al sitio de inicio de la transcripción respectivo.

III.2.5.4 Respuesta de las AtPrxs a giberelinas

Algunos de los factores necesarios para la percepción de giberelinas han sido identificados principalmente en arroz (*Oryza sativa*) y en mutantes de *Arabidopsis* de señalización de giberelinas. En presencia de giberelina (GA), el receptor *GID1* (*GA-INSENSITIVE DWARF1*) se une a ella. El complejo *GID1-GA* interactúa con proteínas *DELLA* (que son reguladores negativos de la acción de giberelinas), dando lugar a la degradación de la proteína *DELLA* a través del complejo *SCFGID2-SLY1*. Esta degradación activa la acción de la giberelina. La presencia de elementos *cis* en la región promotora de los genes de plantas sensibles a giberelinas es suficiente para que respondan a ellas (Rogers *et al.*, 1994). En el promotor de la amilasa *Amy32b* de bajo *pI*, existen cinco elementos de respuesta a GA: el *O2S* (también llamado *Box 2*), la caja de pirimidina (*Pyr box*), el elemento de respuesta a giberelinas (*GARE*), la caja de amilasa (también llamada *Amy Box* y *Box I*) y un elemento de amilasa. Estos cinco son esenciales para un alto nivel de expresión inducido por giberelinas (Rogers *et al.*, 1994). El elemento *GARE* parece estar unido a proteínas nucleares inducibles por giberelina, tales como *GAMYB* y *HRT* (una proteína de dedo de cinc) (López Núñez-Flores *et al.*, 2010). El elemento *O2S* del promotor de *Amy32b* de cebada (Rogers *et al.*, 1994) es similar a la *Box 2* de los genes *Amy2/A* y *Amy2/D* de la avena, conteniendo ambos la secuencia *GATTGACTTGACC*. Curiosamente, este elemento incluye dos secuencias consenso de la *W-box*, *TGAC* (*C/T*), que son reconocidas por proteínas *WRKY* (Zhang *et al.*, 2004).

Mediante la aproximación *in silico* utilizada hasta ahora, se identificaron en los promotores de las *AtPrxs* cuatro tipos de elementos *cis* de respuesta a giberelinas: *W Box/O2S* (*TGACCT*), *Pyr Box* (*YCTTTY*, *TTTTTCC*, *CCTTTT*), *GARE* (*TAACAAR*) y *Amy Box* (*TATCCAY*) (figura III.10). El *W Box/O2S* (Zhang *et al.*, 2004) se encontró exclusivamente en el promotor de *AtPrx 52* y *67* (figura III.10). El *Pyr Box* se encontró en todas las *AtPrxs* excepto en *AtPrx36* (figura III.10). Sólo en el promotor de *AtPrx49* estaba ausente el elemento *cis GARE*, y por último, el elemento *cis Amy Box* (Rogers *et al.*, 1994) se encontró en *AtPrx 4*, *52*, *67* y *72* (figura III.10). Estos resultados sugieren que *AtPrx49* no está regulada por giberelinas, y una vez más *AtPrx52* (y *AtPrx67* en este caso) es la peroxidasa que posee una mayor cantidad de elementos *cis* de respuesta a giberelinas.

Hasta ahora, no se ha encontrado una relación directa entre la aplicación exógena de ácido giberélico y una activación transcripcional de la vía de biosíntesis de monolignoles. En ZePrx, la misma concentración de ácido giberélico (GA3) que inhibe la actividad de ZePrx también tiene la capacidad de inhibir el crecimiento secundario (López Núñez-Flores *et al.*, 2010). En cambio, en varias especies, la ruta de las giberelinas ha estado implicada en la promoción de la xilogénesis en combinación con la ruta de las auxinas (Ragni *et al.*, 2011). En estos estudios, las giberelinas también ejercen un efecto promotor del crecimiento en general, lo que sugiere que una elevada señalización por giberelinas podría simplemente aumentar la producción de xilema junto con un aumento global de crecimiento en altura. Existen estudios mediante el empleo de mutantes de sobreproducción de giberelinas donde se observó una regulación positiva de los genes que pertenecen a la ruta de biosíntesis de monolignoles. Aunque esta activación de genes podría deberse a un incremento indirecto en los niveles de auxina causada por la sobreproducción de giberelinas en los mutantes (López Núñez-Flores *et al.*, 2010). En resumen, a día de hoy no queda claro hasta qué punto son específicos los efectos de las giberelinas en la producción del xilema y desarrollo de las fibras.

Estudios recientes realizados por Ragni *et al.* (2011) han demostrado que las giberelinas y su vía de señalización son necesarios y suficientes para desencadenar directamente el aumento de la xilogénesis en plantas mutantes y transgénicas.

Estudios anteriores en ZePrx (López Núñez-Flores *et al.*, 2010) sugirieron que el ácido giberélico (GA3) regula directamente a ZePrx por medio de un mecanismo que es aparentemente independiente del que presentan las enzimas anteriores de la ruta de biosíntesis de ligninas, y que el promotor de ZePrx puede ser el objetivo de un conjunto de factores de transcripción que están regulados por GA3 durante la inhibición del crecimiento secundario. Dada la alta abundancia de elementos *cis* de respuesta a giberelinas en las AtPrxs (especialmente AtPrx 52 y 67), estos resultados también sugieren que sólo una cierta interacción combinatoria entre los elementos *cis* de respuesta positiva o negativa a giberelinas y sus factores de transcripción determinarían la naturaleza de la expresión/represión de las AtPrxs.

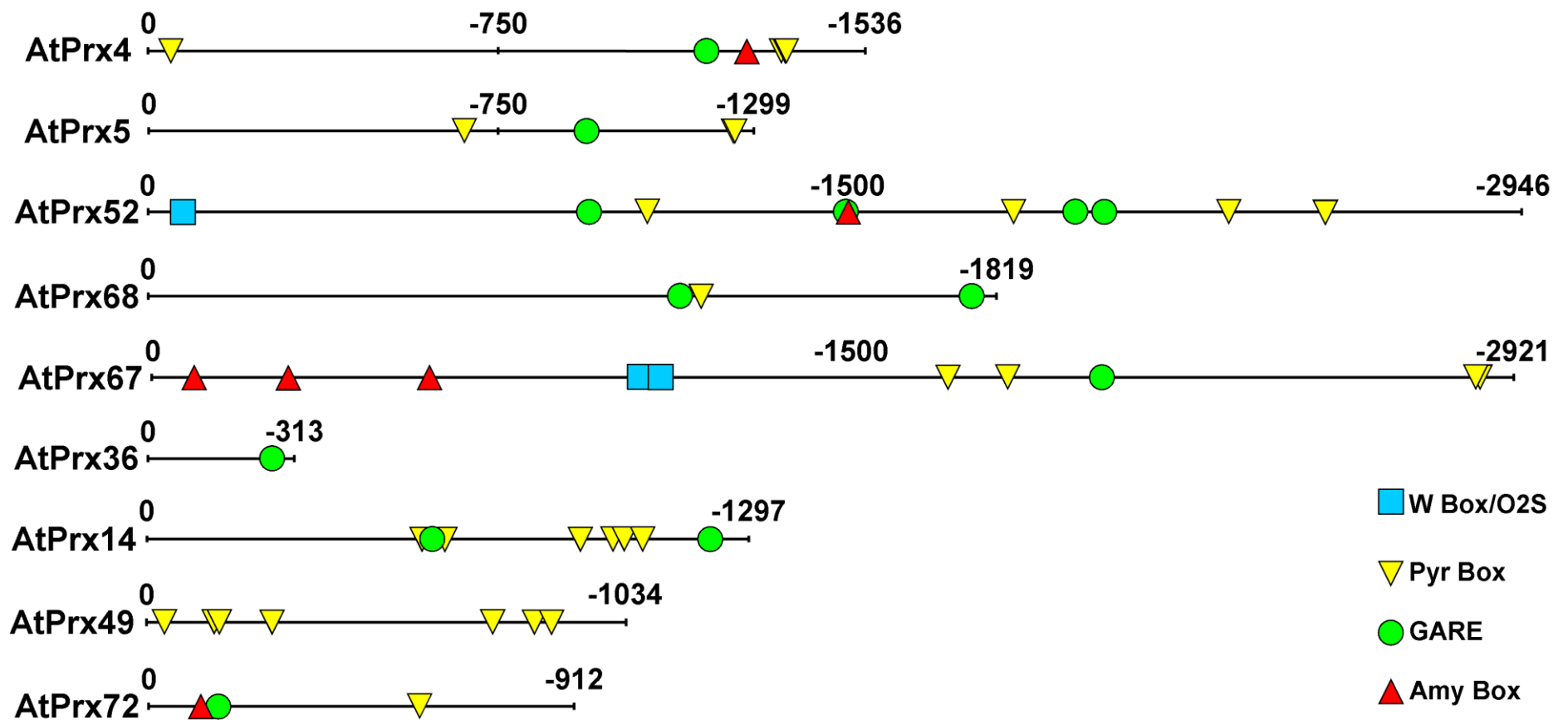


Figura III.10. Cartografía de los elementos *cis* de respuesta a giberelinas (W Box/O2S, Pyr Box, GARE y Amy Box) en los promotores de AtPrxs. La numeración se refiere al sitio de inicio de la transcripción respectivo.

III.2.5.5 Las AtPrxs pueden ser el objetivo de factores de transcripción regulados positivamente por hormonas durante el crecimiento secundario.

La identificación de elementos *cis* reguladores en la mayoría de los genes de la ruta de biosíntesis de monolignoles ha allanado el camino hacia la comprensión de la regulación transcripcional de la biosíntesis de ligninas (Zhao y Dixon, 2011). Un análisis de las secuencias del promotor de las AtPrxs nos ha permitido identificar elementos *cis* reconocidos por factores de transcripción de clase I (CAATNATTG) y III (la secuencia núcleo NTNATNATTNN) de la superfamilia HD-Zip en AtPrx 4, 5, 52, 67, 14, 49 y 72 (figura III.11). En este punto, cabe señalar que las proteínas de la clase III HD-Zip (HD-Zip III) pueden ser unos de los genes vasculares más importantes inducidos por brasinosteroides, y podrían funcionar en la diferenciación del xilema (Fukuda, 2004). Sin embargo, la sobreexpresión de proteínas HD-ZIP III no indujo genes específicos de los elementos traqueales, o genes relacionados con la polimerización de lignina (Ohashi-Ito *et al.*, 2005). De hecho, las proteínas HD-ZIP III pueden estar involucradas en la diferenciación del xilema, pero no en la diferenciación de los elementos traqueales en sí mismos.

Los perfiles de transcripción durante el crecimiento secundario constitutivo o inducido (Oh *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2008) han apoyado la importancia de varios miembros de las familias MYB y NAC de factores de transcripción como reguladores del patrón radial.

El análisis de las secuencias del promotor de las AtPrxs nos ha permitido identificar varios elementos *cis* reconocidos por la superfamilia de factores de transcripción MYB (varias secuencias consenso, como WAACCA, GTTAGTT YAACKG, CNGTTR, AACGG, GGATA, CCWACC, TAACAAA, MACCWAMC , GCATATAC y por último ACCAAA) (figura III.13).

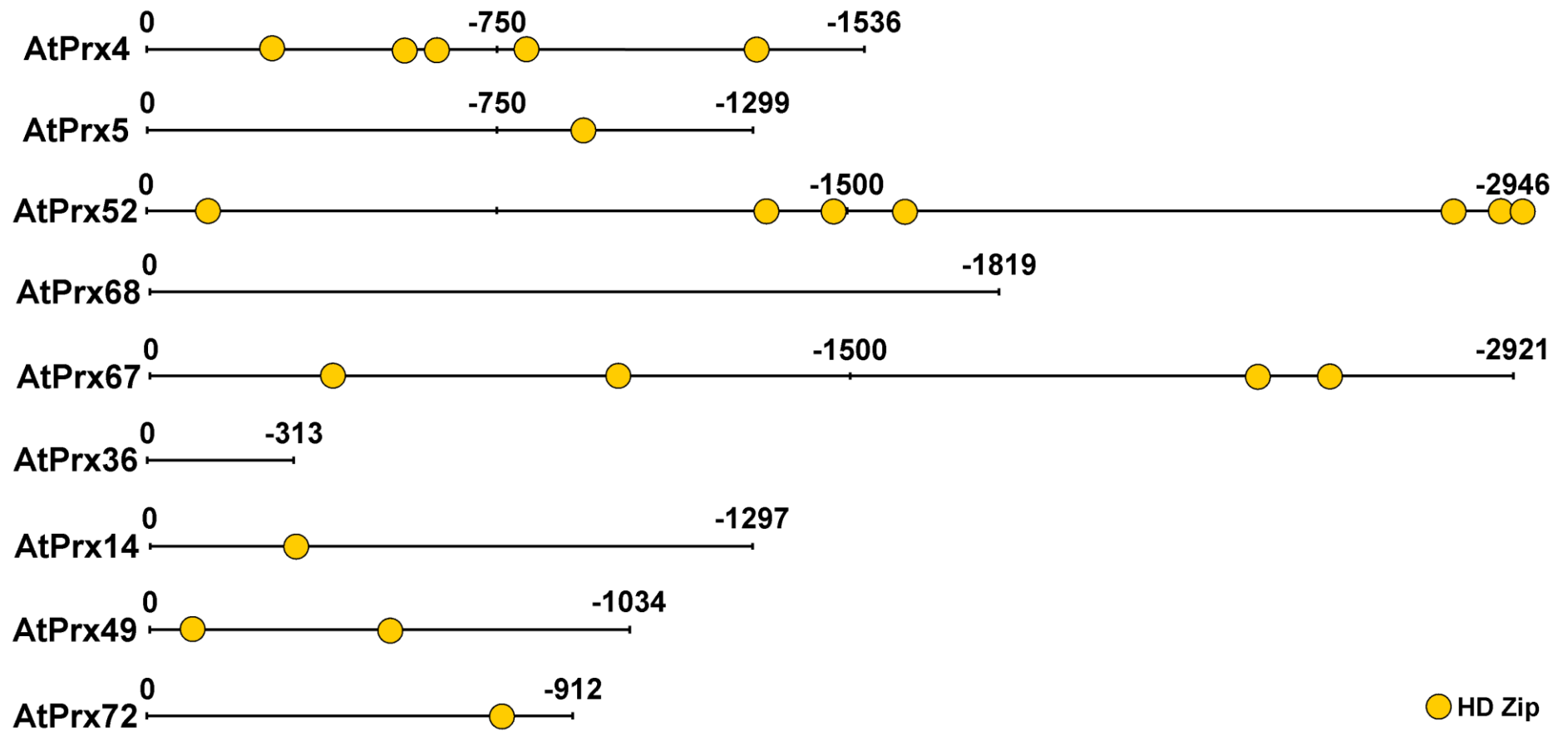


Figura III.11. Cartografía de elementos *cis* diana de factores de transcripción HD Zip en los promotores de AtPrxs. La numeración se refiere al respectivo sitio de inicio de la transcripción.

De hecho, la abundancia de sitios de unión de factores de transcripción como los descritos anteriormente ha sido confirmada mediante análisis bioinformático de los promotores de los genes implicados en la biosíntesis de la pared celular secundaria (Oh *et al*, 2003; Raes *et al*, 2003; Groover y Robischon, 2006; Demura y Fukuda, 2007). En este contexto, un análisis detallado del promotor ha puesto de manifiesto que los elementos ricos en AC correspondientes al motivo de unión del factor de transcripción MYB son necesarios para la activación coordinada de los genes de la ruta monolignol (Zhao y Dixon, 2011). Hay que tener en cuenta que los elementos AC son ubícuos en los promotores de los genes que codifican enzimas biosintéticas de lignina (Raes *et al.*, 2003), incluyendo ciertas peroxidasas que participan en la lignificación (Kawaoka *et al.*, 2000). Un análisis de las secuencias del promotor de las AtPrxs nos ha permitido identificar varios elementos AC reconocidos por la superfamilia de factores de transcripción MYB (tabla III.6 y figura III.12).

AtPrx	Elementos <i>cis</i>					Suma de los cinco elementos <i>cis</i>
	L4DCPAL1 AATCTCCAACCA A[AC][AT]C[TC]C[CG][AC][AG]]C[CG]A	ACIPVPAL2 CCACCAACCC C[CG][AC]C[CAT][ACG][ACG][CG][CT][C] A][CG]C	MYBPZM CC[TA]ACC C[CT][AT]A CC	SITEIATCYTC TGGGC[TC] [TC]GG[GC][CG][CT]	ACCAAA secuencia núcleo	
4	0	0	1	1	2	4
5	0	0	2	0	3	5
52	0	0	1	4	4	9
68	0	0	0	1	0	1
67	0	0	3	3	0	6
36	0	0	1	0	0	1
14	0	0	1	0	2	3
49	0	0	0	0	2	2
72	1	0	0	3	0	4
Total	1	0	9	12	13	35
Media nº motivos/gen	0,11	0	1	1,33	1,44	3,88

Tabla III.6. Frecuencia de cada elemento AC en los promotores de los 9 genes de peroxidasa de *Arabidopsis thaliana* candidatos para ser homólogos a ZePrx y probablemente involucrados en la biosíntesis de ligninas.

Mención especial debe hacerse de los motivos ricos en AC tales como la caja PAL, CCAC(A/C)AN(A/C)N(C/T)(A/C) (Kawaoka *et al.*, 2000), y la secuencia núcleo, ACCAAA, la cual es reconocida por la familia MYB4 de factores de transcripción (Patzlaff *et al.*, 2003).

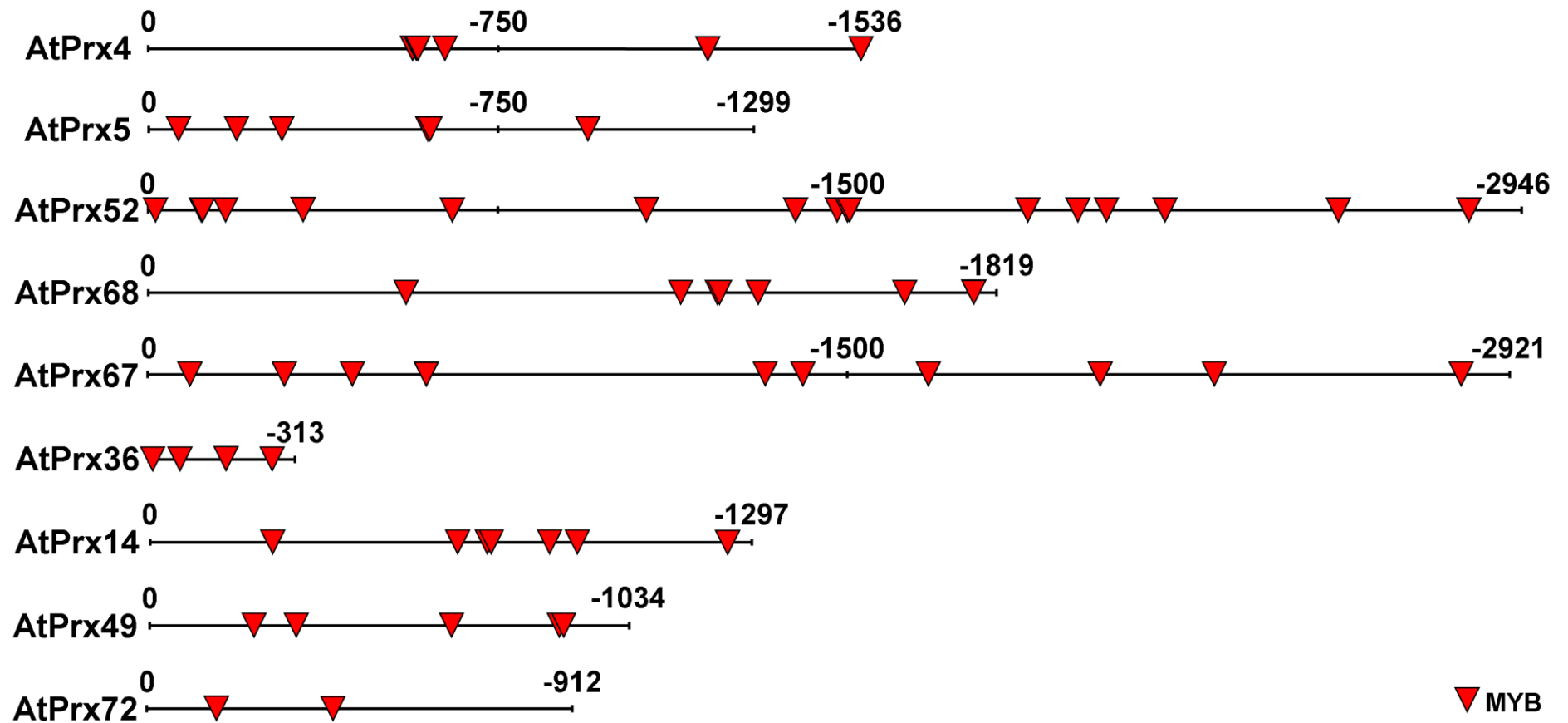


Figura III.12. Cartografía de elementos *cis* diana de factores de transcripción MYB en los promotores de AtPrxs. La numeración se refiere al respectivo sitio de inicio de la transcripción.

En este contexto, la mayoría de los genes monolignol están regulados directamente por los reguladores MYB a través de elementos AC (Zhao y Dixon, 2011). En nuestro caso, sólo AtPrx 4, 5, 52, 14 y 49 tienen la secuencia núcleo ACCAAA (tabla III.6). Sin embargo, los MYBs no son los únicos factores de transcripción que pueden regular la ruta de las ligninas. Algunos interruptores maestros de la lignificación de tipo MYB son objetivos directos de factores de transcripción de tipo NAC que regulan todo el programa de la pared celular secundaria en *Arabidopsis* (Zhao y Dixon, 2011).

Se ha demostrado que los factores de transcripción NAC regulan todo el programa de la pared celular secundaria en *Arabidopsis* (Zhao y Dixon, 2011) y son reguladores transcripcionales clave de la biosíntesis de la pared secundaria en diversos tipos de células del esclerénquima (Zhong *et al.*, 2008). De hecho, la sobreexpresión de genes NAC provoca lignificación ectópica (deposición de lignina en otros tipos celulares diferentes) (Zhong *et al.*, 2008; Zhao y Dixon, 2011); por tanto los NAC son interruptores maestros capaces de activar toda la ruta de biosíntesis de ligninas (Zhong *et al.*, 2008). Ensayos de microarrays en cultivos de células de *Arabidopsis* así como un análisis del promotor ha puesto de manifiesto la posible participación de algunos factores de transcripción NAC específicos de plantas inducibles por auxinas y citoquininas en la formación del xilema (Yamaguchi *et al.*, 2008), lo que sugiere que los genes NAC son interruptores transcripcionales para la formación del metaxilema y de los vasos del protoxilema en la planta.

Por último, un análisis de las secuencias del promotor de las AtPrxs ha permitido identificar varios elementos *cis* reconocidos por la superfamilia de factores de transcripción NAC (las secuencias CATGT, CACG y el elemento de unión NAC de pared secundaria (SNBE) (T/A)NN(C/T)(T/C/G)TNNNNNNNA(A/C)GN(A/C/T)(A/T), McCarthy *et al.*, 2011) (figura III.13).

AtPrx52 es una vez más la peroxidasa mejor posicionada con un elevado número de elementos *cis* reconocidos por factores de transcripción NAC. Por otra parte, hay que señalar que la sobreexpresión de factores de transcripción NAC en *Arabidopsis* induce el engrosamiento de la pared secundaria y a AtPrx52 (también a AtPrx49) (Mitsuda *et al.*, 2005), demostrando una vez más que este es el homólogo de ZePrx mejor posicionado (E-valor = 1e-80).

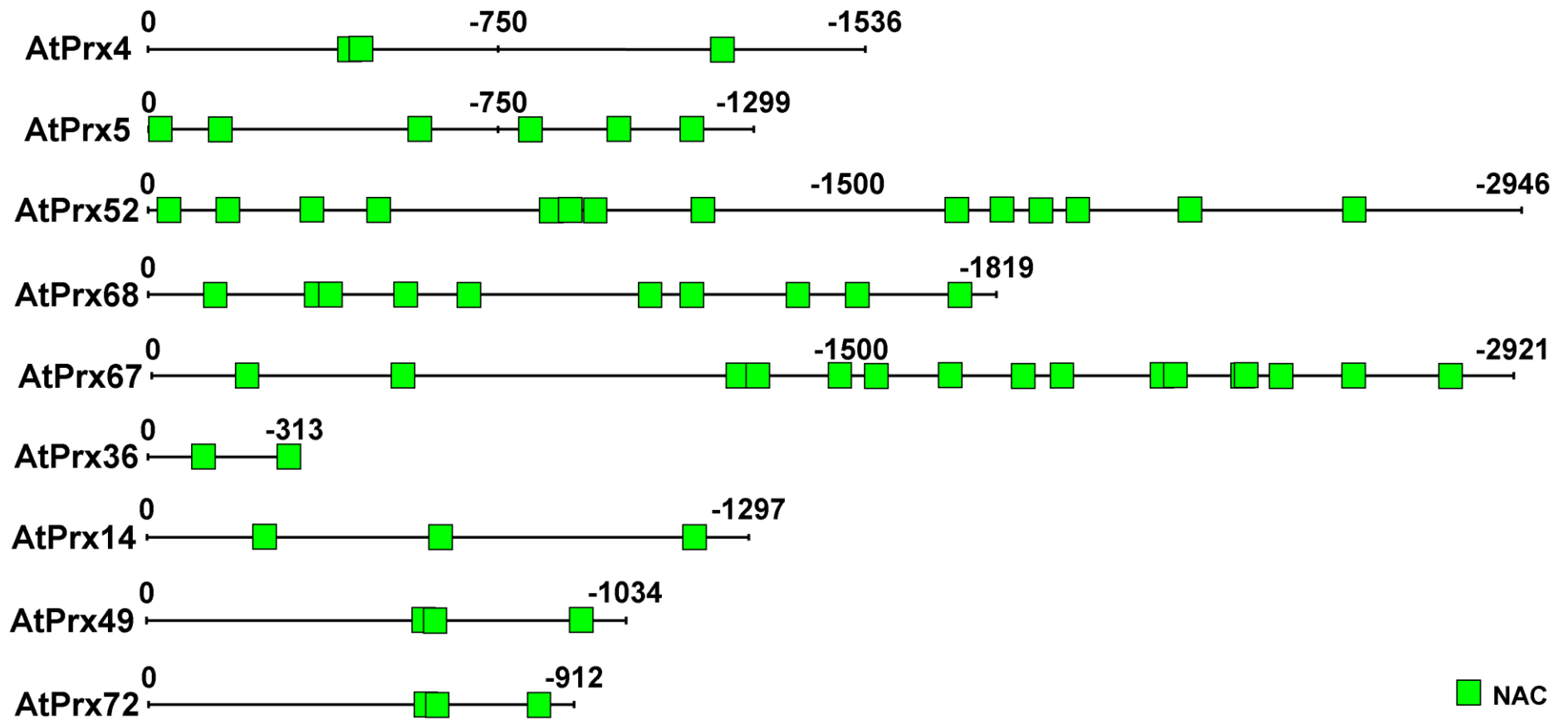


Figura III.13. Cartografía de elementos *cis* diana de factores de transcripción NAC en los promotores de AtPrxs. La numeración se refiere al respectivo sitio de inicio de la transcripción.

III.2.5.6 Elementos *cis* de respuesta a NO y H₂O₂ en las regiones promotoras de las AtPrxs

Se sabe que los genes regulados positivamente por NO y H₂O₂ contienen elementos *cis* del tipo caja ACGT, caja OCS (del inglés: *octopine synthase*), caja OPAQ (opaque-2), caja L1BX (L1 Box), caja MYCL (del inglés: *myelocytomatosis viral oncogene homologue L*) y caja W. Las cajas ACGT, OCS y OPAQ son conocidos sitios de unión para factores de transcripción de la familia bZIP (Kim *et al.*, 1997), la caja L1BX es un conocido lugar de unión para factores de transcripción de la familia HD-ZIP IV (Abe *et al.*, 2001), la caja MYCL es un sitio de unión de factores de transcripción de la familia bHLH (Abe *et al.*, 1997) y las cajas OCS y W son sitios de unión de la familia de factores de transcripción WRKY (Rushton *et al.*, 2010).

El análisis de las secuencias del promotor de las AtPrxs ha permitido múltiples copias de elementos *cis* relacionados con la regulación por el NO y H₂O₂ (la caja ACGT, la caja OPAQ, el L1BX, la caja MYCL y la caja W) (figura III.14) (Palmieri *et al.*, 2008). En concreto, sólo las regiones promotoras de AtPrx 4, 5, 52 y 72 contienen los cuatro tipos de elementos *cis* descritos anteriormente y en cantidad suficiente para responder a NO y H₂O₂ de la misma forma que ZePrx.

Sorprendentemente, algunas de las peroxidasas candidatas en la biosíntesis de ligninas, como AtPrx49 e incluso AtPrx67, muestran una ausencia importante de elementos *cis* de respuesta a NO y H₂O₂ (figura III.14), y por lo tanto han sido rechazadas en nuestra búsqueda de homólogos de ZePrx.

Los elementos *cis* anteriormente descritos a menudo se encuentran en *clusters* en los promotores de genes regulados positivamente por NO (Palmieri *et al.*, 2008), lo que sugiere una posible acción sinérgica de las proteínas WRKY con otras proteínas WRKY y/o con otras clases de factores de transcripción (Rushton *et al.*, 2010).

Por tanto, muchos de los genes inducidos en plantas de *Arabidopsis* después de un tratamiento con NO tienen más de uno de estos elementos *cis* en sus regiones promotoras (Palmieri *et al.*, 2008). Rushton *et al.* (2010) demostraron interacciones de proteínas WRKYs, tanto con sus propios promotores como con los de otros miembros de la familia, lo que sugiere que los factores de transcripción de respuesta a H₂O₂/NO (bZIP, HD-ZIP clase IV, bHLH y WRKY) están ampliamente involucrados en la autorregulación y regulación cruzada.

Por su parte, el elemento OCS merece una mención especial. En *Arabidopsis*, las secuencias del elemento OCS son importantes para la expresión de los genes GST6 y PR1 (Chen y Singh, 1999). Al igual que otros elementos OCS, éste contiene la secuencia TACG, que es reconocido por OBF5, un factor de transcripción de tipo bZIP altamente conservado (Chen y Singh, 1999), y la secuencia de 10 pb, ACACTTTTGG, que es reconocido por OBP1, una proteína de dominio DOF que se une aguas abajo del elemento de OCS en el promotor de GST6 (Chen y Singh, 1999). Sin embargo, la arquitectura del elemento OCS es más compleja de lo que parece, como fue demostrado por Gómez Ros *et al.* en 2012 con el promotor de ZePrx.

No se ha podido encontrar ningún elemento OCS en los promotores de AtPrx, pero sí se han encontrado evidencias sobre su posible presencia, como por ejemplo, la presencia de la secuencia TACG y la secuencia ACACTTTTGG, junto con la presencia de numerosos sitios de unión de proteínas de dominio DOF (AAAG y su inversa). Sin embargo, AtPrx 36, 49 y 72 no contienen alguno o ninguno de estos elementos esenciales del elemento OCS.

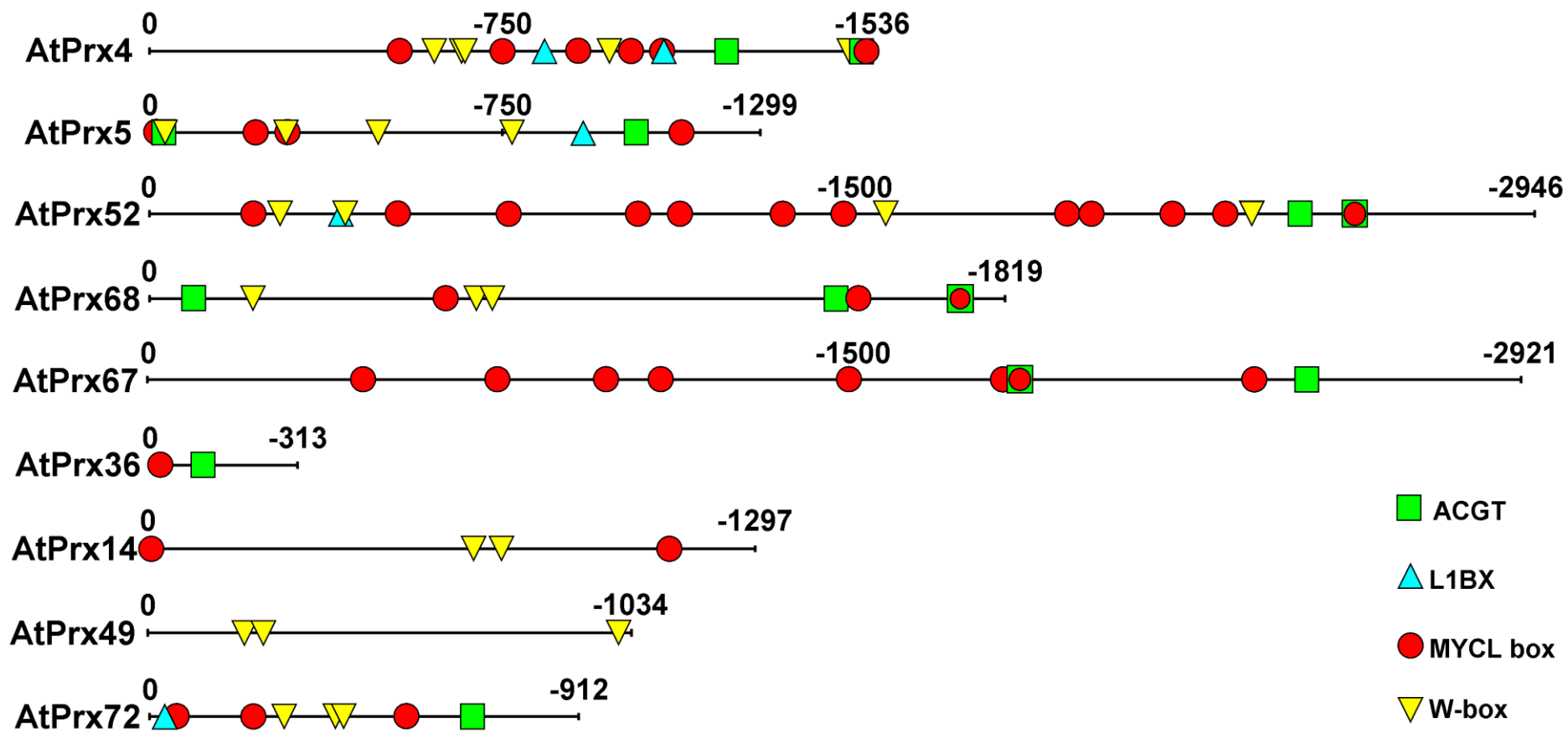


Figura III.14. Cartografía de elementos *cis* de respuesta a NO y H₂O₂ en los promotores de AtPrxs. La numeración se refiere al respectivo sitio de inicio de la transcripción.

En resumen, se ha realizado un exhaustivo análisis bioinformático desde la proteína hasta el gen de las peroxididasas de *Arabidopsis* con una homología igual o superior a E-valor $1e-80$, demostrándose hasta qué punto es posible afinar en la búsqueda de una proteína ortóloga y su posible función.

Los resultados indicaron en un primer momento (hasta el nivel de mRNA) que las peroxididasas AtPrx4, 52, 49 y 72 poseen características estructurales similares a ZePrx, su patrón de glicosilación así como su distribución de cargas superficiales, indican que ejercen su función en la pared celular. Sin embargo, sólo AtPrx 52 y 72 poseen las características estructurales más parecidas a ZePrx.

Los mRNA de estas cuatro peroxididasas contienen varios elementos en sus secuencias que les confieren corta longevidad pero también algún que otro elemento no específico que confiere longevidad, lo que sugiere que la traducción del mRNA en proteínas se lleva a cabo mediante mecanismos estándar.

Sin embargo, la peroxidasa con mayores probabilidades de ser homóloga (ortóloga) a ZePrx, es AtPrx52, seguida de AtPrx72. Los resultados sugieren que las hormonas (auxinas, citoquininas, brasinosteroides y giberelinas) regulan probablemente a AtPrx52 y que su promotor puede ser diana de un conjunto de factores de transcripción (NAC, MYB, AP2 y HD Zip de clase I y III) los cuales están regulados positivamente por las hormonas mencionadas durante el crecimiento secundario, apoyando el papel de AtPrx52 en la diferenciación/lignificación del xilema.

Además, AtPrx52 está regulada positivamente por NO y H₂O₂. Su promotor contiene múltiples copias de todos los elementos *cis* conocidos que confieren regulación por NO y H₂O₂ (ACGT box, OCS box, OPAQ box, LIBX, MYCL box y W box). La presencia de estos elementos reguladores sugieren que AtPrx52 está finamente regulada de la misma forma que ZePrx, como sería de esperar de una enzima que cataliza el último, e irreversible, paso de la formación de ligninas.

Por otro lado, aunque AtPrx72 carece de alguno de los tipos de factores de transcripción mencionados, es de esperar que esté también fuertemente regulada por hormonas así como por H₂O₂ y NO. A pesar de que AtPrx4 en principio cumple mejor estos requisitos de regulación hormonal, sus características a nivel de proteína (pI, estructura, distribución de cargas, patrón de glicosilación) en comparación con AtPrx72, la alejan de ZePrx.

Pero además, existen evidencias bibliográficas que sugieren la mayor probabilidad de que AtPrx72 juegue un papel importante en lignificación (Lebedeva *et al.* 2003; Armengaud *et al.* 2004; Valério *et al.* 2004; Irshad *et al.* 2008).

AtPrx72 ha sido identificada en la pared celular de hipocotilos etiolados de *Arabidopsis* en una fase de detención del crecimiento del hipocotilo (11 días de edad), y ha sido clasificada como proteína implicada en la expansión de la pared celular (Irshad *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que AtPrx72 se expresa en raíces y tallos de *Arabidopsis* (Valério *et al.*, 2004).

En sus estudios de nutrición por potasio, Armengaud *et al.* (2004) describieron que AtPrx72 es una peroxidasa de pared celular. También, Lebedeva *et al.* (2003) vieron que AtPrx72 tenía niveles aceptables de expresión en sus plantas de estudio.

Pero más importante aún es el estudio de Kubo *et al.* (2005) quienes, basados en el sistema modelo de células del mesófilo de *Zinnia* en transdiferenciación, establecieron un sistema *in vitro* de transdiferenciación de cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis* para obtener un perfil de expresión de los genes relacionados con la diferenciación de las células del xilema. En este estudio, los análisis de microarrays indicaron que 1705 genes sufrieron cambios de más de ocho veces en sus niveles de expresión. Entre estos genes, AtPrx72 estaba presente en uno de los grupos en los que la expresión se veía aumentada cuando se estaban formando activamente los elementos de los vasos del xilema.

Por tanto, estas evidencias, junto con sus características estructurales muy próximas a ZePrx, hacen que AtPrx72 sea tomada en consideración al igual que AtPrx52.

**IV. Capítulo II: Análisis funcional de las peroxidasas
52 y 72 de *A. thaliana*, implicadas en procesos de
lignificación**

IV.1 Materiales y Métodos

IV.1.2 Material Vegetal

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh es una pequeña planta herbácea de entre diez y treinta centímetros de altura. Posee un tallo erecto con ramificaciones que surge desde la base de la planta y está cubierto de pelos ramificados, dispuestos muy densamente y cortos, que van desapareciendo a medida que se aproxima a las inflorescencias. Tiene dos tipos de hojas, las basales de hasta 2×0,5 cm, pegadas al suelo y formando una roseta de cuyo centro nace el tallo; y las caulinares, más pequeñas, alargadas y sésiles.

Las flores se presentan en inflorescencias de tipo racimo en el extremo del tallo o de las ramas, son pequeñas, hermafroditas y de color blanco. Están formadas por cuatro verticilos concéntricos con los cuatro órganos florales dispuestos de la siguiente forma, de afuera hacia adentro: 4 sépalos (verdes), 4 pétalos (blancos), 6 estambres (órganos masculinos) y dos carpelos (órganos femeninos). El fruto es una silicua de unos dos centímetros de largo y dos milímetros de ancho, que puede llegar a contener cerca de treinta semillas.



Figura IV.1. Detalle de la roseta basal (izquierda) y de la inflorescencia (derecha).

Comparte familia con un amplio abanico de especies de interés agrícola como la col (*Brassica oleracea*), el nabo (*Brassica napus*) o el rábano (*Raphanus sativus*) y culinario como la mostaza (*Brassica campestris*), la mostaza blanca (*Sinapis alba*) y la negra (*Brassica nigra*). También está emparentada con la rúcula (*Eruca vesicaria*), sólo

por citar algunos ejemplos de la amplia familia de las brassicáceas a la que pertenece *Arabidopsis thaliana*. Dentro del género *Arabidopsis*, se agrupan 9 especies y 8 subespecies.

Arabidopsis es una planta cosmopolita que se encuentra distribuida en todos los continentes, si bien es poco abundante en Asia y África, y escasa en algunas regiones de América. En climas cálidos y templados, se la encuentra en prados, márgenes de camino o terrenos abandonados. Se han identificado cientos de variedades con diferencias en la forma, el crecimiento o el tiempo de floración, como adaptación a las condiciones ambientales. Algunas de ellas reciben la categoría de ecotipo, una subdivisión genética y ecológica de la especie por adaptación ambiental en las condiciones locales.

Su ciclo de vida es corto, generalmente inferior a un año, aunque en el laboratorio se puede completar en un período de entre seis a ocho semanas. En climas templados esta planta florece entre los meses de febrero y junio.

IV.1.3 Cultivo *in vitro*, crecimiento y selección de mutantes

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0), *atprx52Salk* (Salk Institute Genome Analysis Laboratory, SIGnAL), línea SALK_081257.50.70.x; *atprx52SM* (John Innes Center), línea SM_3_1699; *atprx72Salk* (Salk Institute Genome Analysis Laboratory, SIGnAL), línea Salk_136893.44.70.x; y *atprx72Sail* (Syngenta), línea Sail_891_H09, se adquirieron en el Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASc) OnLine Catalog a través de su página web: <http://nasc.nott.ac.uk/home.html>.

Una vez recibidas se realizó el protocolo de desinfección y vernalización que consistió en lavar las semillas con etanol 70% durante 1 minuto y después 10 minutos con lejía 10% en agitación. A continuación se realizaron 4 lavados con agua estéril Milli-Q para eliminar la lejía. Una vez lavadas se dejaron durante 3 días en condiciones de frío (4°C) y oscuridad (Harrison *et al.*, 2006) antes del cultivo *in vitro*.

Las semillas de las 4 líneas mutantes y el ecotipo silvestre se colocaron en medio MS suplementado con 0,1 % (p/v) de sacarosa con 50 µg ml⁻¹ de kanamicina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) como agente seleccionante para las líneas Salk (SALK_081257.50.70.x y Salk_136893.44.70.x) y 10 µg ml⁻¹ de glufosinato amonio

(Pestanal[®], Sigma-Aldrich, Madrid, España) como agente seleccionante para las líneas SM y Sail (SM_3_1699 y Sail_891_H09).

A continuación las semillas se expusieron a 6 horas de luz para inducir la germinación, y después se mantuvieron en oscuridad durante 2 días a 24°C, tal y como describe Harrison *et al.*, (2006). Una semana después de la germinación, las plantas se trasplantaron a macetas con tierra. Col-0 se utilizó como control negativo, y las cuatro líneas mutantes y Col-0 crecidas en ausencia de kanamicina y Pestanal[®] se utilizaron como control positivo.

Las plantas en maceta crecieron en condiciones controladas con un régimen de temperatura día/noche de 22°C/20°C, humedad relativa 60% y fotoperiodo de 16 horas de luz (135 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en una cámara de cultivo Ing. Climas 450 Growth Chamber (Ing. Climas, Barcelona, Spain).

IV.1.4 Análisis fenotípico

Los análisis del desarrollo de Col-0 y las cuatro líneas mutantes se hicieron de acuerdo al protocolo descrito por Boyes *et al.* en 2001, con algunas modificaciones. Al menos 25 plantas de cada tipo se crecieron en macetas individuales de 5 cm de diámetro utilizando el sistema AraSystem (Betatech, Gante, Belgica). Las medidas se tomaron cada dos días y consistieron en medidas manuales de la altura de los tallos, número de ramas y silicuas, y toma de fotografías para posterior cálculo de la tasa de germinación, área y radio de la roseta mediante análisis de imagen digital con el software ImageJ versión 1,49a (National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

IV.1.5 Aislamiento de DNA y amplificación

El aislamiento de DNA genómico de las hojas de plantas de al menos 2-3 semanas de edad se hizo siguiendo los protocolos de Edwards *et al.* (1991) para la extracción rápida de DNA adecuado para el análisis por PCR.

La detección de los individuos mutantes homocigotos se hizo mediante amplificación por PCR de acuerdo con los protocolos proporcionados por el SIGnAL (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>), posterior electroforesis en gel de agarosa al 1% y revelado con RealSafe (Durviz, Valencia, España)

El diseño de los cebadores (también llamados *primers*, del inglés) se realizó utilizando la herramienta de diseño de cebadores del SIGnAL. En resumen, el genotipo de cada planta se determinó mediante una reacción de PCR con tres cebadores. El cebador izquierdo y el derecho para detectar el alelo silvestre, y un cebador del extremo del T-DNA para detectar la inserción (figura IV.5) (Østergaard y Yanofsky, 2004).

IV.1.6 Medida de los niveles de expresión génica mediante Real Time RT-PCR (Q-PCR)

IV.1.6.1 Aislamiento de RNA

Se utilizaron muestras de hojas procedentes de las plantas mutantes y Col-0 con 30 días de edad y/o tallos entre 5-10 cm. La extracción del RNA total se realizó mediante ruptura mecánica en frío utilizando el kit Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent Technologies, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA se calcularon mediante la medida de la absorbancia a 260 nm en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos). La pureza e integridad del RNA se evaluó utilizando el sistema RNA Nano Labchips (Agilent Technologies, California, Estados Unidos) en un bioanalizador Agilent 2100B (Agilent Technologies, California, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

IV.1.6.2 Cuantificación de mRNA mediante *Real-Time* RT-PCR (Q-PCR).

La síntesis de la hebra directa de los cDNAs se hizo a partir de 1 µg de RNA total en un volumen final de reacción de 25 µl utilizando el kit *High Capacity RNA to*

cDNA (Life Technologies, Madrid, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Como control para la contaminación genómica, las mismas reacciones se hicieron pero en ausencia de transcriptasa reversa. La cuantificación mediante Real-Time PCR se realizó utilizando el sistema 7900 HT Fast Real-Time PCR System” (Life Technologies, Alcobendas, Madrid, España) en un volume final de reacción de 10 µl que contenía 2,5 µl de *cDNA* y 5µl de FastStart Universal SYBRGreen Master (Rox) (Roche, Barcelona, España) junto con 300 nM de los cebadores específicos (Sigma), diseñados mediante el programa Primer Express Software 2.0 (Life Technologies, Madrid, España). Las condiciones de la Real-time PCR consistieron en 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60 °C.

Cada *cDNA* se ensayó por duplicado en cada reacción de PCR. Tras la amplificación se realizó un análisis de la curva de melting para verificar la especificidad de la reacción. Los datos se recogieron por medio del programa SDS 1.9.1 software (Life Technologies, Madrid, España) y se analizaron con RQ Manager (Life Technologies, Madrid, España), definiendo a Col-0 como muestra calibradora y ACT8 como gen de referencia.

Para la cuantificación, la abundancia de cada gen se determinó relativa al transcrito de referencia ACT8 y los datos finales sobre la expresión génica relativa entre los mutantes testados se calculó siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los cebadores utilizados se muestran en la tabla IV.1.

Nombre del cebador	Secuencia (5´-3´)	Diana	Código de acceso
ACT8 L ACT8 R	tcagcactttccagcagatg acaatgcctggacctgctt	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>actina8</i>	At1G49240
Prx52 L Prx52 R	ttcgagtctgagccaactcat attgtccgatcgtgtgtgc	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>atprx52</i>	AT5G05340
Prx72 L Prx72 R	gtcgctaaagcattcgaaca tgacgaaacagtcgtggaaa	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>atprx72</i>	AT5G66390

Tabla IV.1. Secuencia de los cebadores usados para la cuantificación de los diferentes genes de peroxidasa de *A. thaliana* mediante *Real Time* RT-PCR (Q-PCR).

IV.1.7 Extracción y determinación de la cantidad de proteínas

Las extracciones de proteínas se realizaron mediante homogeneización mecánica en mortero utilizando como tampón de extracción 0,1 M Tris-HCl (pH 7,0), 10 mM ácido ascórbico y 5 mM EDTA y PVP (0,6 g/g de tejido).

La cuantificación de proteínas se hizo mediante el método de Bradford (1976) usando el kit comercial de Bio-Rad (Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando seroalbúmina bovina como proteína estándar para obtener la recta patrón.

IV.1.8 Determinación de la actividad peroxidasa

La determinación de la actividad peroxidasa se realizó según describe Ferrer *et al.* (1992). Se registró el incremento de absorbancia por minuto a 593 nm, en un medio de reacción que contenía tampón 50 mM Tris-acetato (pH 5,0), 1 mM 4-metoxi- α -naftol (Sigma, Madrid, España) y 0,33 mM H₂O₂ (Merck Millipore, Madrid, España) y el extracto proteico correspondiente en un volumen final de 1 mL y a una temperatura de 30 °C. La reacción enzimática comenzó al añadir el extracto proteico. La actividad enzimática se expresó en nkat (nmoles de sustrato oxidado s⁻¹) utilizando un coeficiente de extinción (ϵ) de 21000 M⁻¹cm⁻¹.

IV.1.9 Extracción y cuantificación de fenoles

La cuantificación del contenido total de fenoles se hizo según el protocolo descrito por Velioglu *et al.* (1998). En resumen: 200 mg de tallos de cada línea mutante y Col-0 se incuban con 2 ml de metanol (80%) + 1% HCl durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación orbital. La mezcla se centrifuga a 1000g durante 15 min en una centrífuga Heraeus™ Multifuge™ X1, con rotor de ángulo fijo (10,7 cm de radio) (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos), quedándonos con el sobrenadante. El extracto metanólico se diluye a una concentración 1/30 mediante

diluciones seriadas. Se añaden 100 µl de extracto metanólico y 0,75 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac, Barcelona, España) diluído 10 veces en un tubo de ensayo. Se mezcla, se deja reposar y añaden 0,75 ml de carbonato cálcico 6% (p/v) (Panreac, Barcelona, España). La mezcla se deja reposar 90 min y se mide la absorbancia a 725 nm utilizando ácido ferúlico (Panreac, Barcelona, España) como patrón.

IV.1.10 Extracción y cuantificación de azúcares solubles

El contenido de azúcares se determinó usando el método del fenol-sulfúrico de acuerdo con Dubois *et al.* (1956).

Se utilizaron hojas de cada línea mutante y Col-0. Las muestras se homogeneizaron en mortero con agua destilada. Tras centrifugación a 1000 g durante 5 min en una centrífuga Heraeus™ Multifuge™ X1, con rotor de ángulo fijo (10,7 cm de radio) (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) se recogió el sobrenadante y se mezcló 250 µl del extracto acuoso de hoja con 250µl de fenol (Merck Millipore, Madrid, España). Se agitó y se añadió 1ml de ácido sulfúrico 97% (Merck Millipore, Madrid, España). Se agitó y se dejó enfriar durante 5 min. A continuación se midió la absorbancia a 490 nm. La concentración se calculó empleando glucosa como patrón.

IV.1.11 Extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Para la cuantificación de los diferentes pigmentos se emplearon los métodos de Arnon (1949) y Lichtenthaler (1987).

En el protocolo de Arnon (1949), 50 mg de muestra son triturados en mortero junto con 10 ml de acetona (80%) (Panreac, Barcelona, España). El triturado se filtra para obtener un extracto limpio, y se mide su absorbancia a 663 nm y 645 nm.

A partir de los valores de absorbancia se calcula la concentración de clorofilas según la ecuación experimental desarrollada por Arnon:

$$\text{Clorofila } a \left(\frac{\text{mg}}{\text{g PF}} \right) = [(12,7 \times A_{663}) - (2,6 \times A_{645})] \times \frac{0,01 \text{ L acetona}}{0,05 \text{ g PF}}$$

$$\text{Clorofila } b \left(\frac{\text{mg}}{\text{g PF}} \right) = [(22,9 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})] \times \frac{0,01 \text{ L acetona}}{0,05 \text{ g PF}}$$

Clorofilas totales: Chl *a* + Chl *b*

El protocolo de Lichtenthaler, permite además calcular el contenido de carotenoides (xantofilas + carotenos).

Según este protocolo, los pigmentos se extraen a partir de 0,1 g de peso fresco y se homogeneizan en 10 ml de acetona al 80% durante 2 minutos en oscuridad. Con el fin de eliminar los restos de material vegetal, el homogeneizado se centrifuga a 1000g durante 15 minutos en una centrífuga Heraeus™ Multifuge™ X1, con rotor de ángulo fijo (10,7 cm de radio) (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos), en tubos protegidos de la luz con papel de aluminio, para evitar de esta manera la fotodegradación de los pigmentos. El sobrenadante se vuelca a otros tubos fotoprotectados, desechándose el precipitado.

Se toman 0,2 ml del sobrenadante anterior a los que se añaden 2 ml de acetona al 80% y se agita. Posteriormente se mide la absorbancia a 750, 663, 646 y 470 nm. Para valorar la turbidez del extracto se mide la absorbancia a 750 nm, ya que las clorofilas no absorben en esa longitud de onda. La absorción máxima de las clorofilas se encuentra en la región roja y azul del espectro visible, por eso se miden las absorbancias a 663 y 646 nm, máximos de absorción para la clorofila *a* y la clorofila *b* respectivamente, en el caso de utilizar como disolvente acetona 80%. El contenido de carotenoides totales (carotenos y xantofilas) se valora por medida de absorbancia a 470 nm. La concentración de clorofilas se calcula mediante las siguientes fórmulas, teniendo en cuenta que el disolvente empleado es acetona 80%.

$$\text{Chl}_a \text{ (}\mu\text{g / ml)} = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{646}$$

$$\text{Chl}_b \text{ (}\mu\text{g / ml)} = 21,50 \times A_{646} - 5,10 \times A_{663}$$

$$\text{Chl}_{a+b} = 7,15 \times A_{663} + 18,71 \times A_{646}$$

$$C_{x+c} \text{ (Carotenoides) (}\mu\text{g / ml)} = (1000 \times A_{470} - 1,82 \text{ Chl}_a - 85,02 \text{ Chl}_b) / 198$$

x + c = xantofilas + carotenos

IV.1.12 Estudio de la fluorescencia de la clorofila *a*. Test JIP

La emisión de fluorescencia de la clorofila *a* se valoró utilizando un fluorímetro Handy PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Norfolk, UK) (figura IV.2) sobre una muestra de 20 plantas por cada línea mutante y bajo dos condiciones: plantas control (sin tratamiento) y con tratamientos de inducción de estrés fotooxidativo (ver sección IV.1.14).

Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente en plantas con tallos de entre 5-10 cm de altura y sobre hojas maduras de la roseta. Se indujo la emisión de fluorescencia mediante la aplicación de un pulso de un segundo de luz saturante ($3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) roja (longitud de onda de máxima intensidad, 650 nm), producida por tres diodos (LEDs) y focalizada sobre un área de 4 mm de diámetro. Previamente a la medida, las muestras eran mantenidas en oscuridad durante 15-30 minutos mediante el empleo de las pinzas suministradas por el equipo para tal efecto. La fluorescencia emitida era detectada en el fluorímetro mediante un fotodiodo, después de haber atravesado un filtro con 50% transmitancia a 750 nm.



Figura IV.2. Fluorímetro de fluorescencia continua Handy PEA (Hansatech Instruments, UK) con los clips para hojas, como el empleado en esta Tesis.

El análisis de fluorescencia de la clorofila *a* se realizó mediante la aplicación del denominado test JIP (Strasser y Strasser, 1995), teniendo en consideración la información correspondiente a los diferentes flujos energéticos que se producen en el aparato fotosintético (ver sección I.5.1 de la Introducción, figura I.14). El conjunto de parámetros OJIP que se midieron se encuentran en la tabla IV.2.

Parámetros técnicos		
Fluorescencia a 50 μ s	F _o	
Fluorescencia máxima	F _m	
Fluorescencia variable a 2 ms	F _v	= F _m -F _o
Pendiente desde el origen de la fluorescencia	M _o	= (F ₃₀₀ μ s-F _o)/(F _m -F _o)
Fluorescencia variable relativa a 2 ms	V _j	= (F _{2ms} -F _o)/(F _m -F _o)
Flujos específicos expresados por centro de reacción (reaction center, RC)		
Absorción por RC	ABS/RC	= (M _o /V _j)/(1-F _o /F _m)
Atrapamiento a tiempo 0 por RC	TR _o /RC	= M _o /V _j = (ABS/RC) ϕ_{p_0}
Disipación a tiempo 0 por RC	DI _o /RC	= (ABS/RC) - (TR _o /RC)
Transporte electrónico a tiempo 0 por RC	ET _o /RC	= (TR _o /RC) ψ_0
Flujos fenomenológicos expresados por área de tejido foliar (cross section, CS)		
Absorción por CS	ABS/CS	= F _o o F _m
Atrapamiento a tiempo 0 por CS	TR _o /CS	= (TR _o /ABS)/(ABS/CS)
Disipación a tiempo 0 por CS	DI _o /CS	= (ABS/CS) - (TR _o /CS)
Transporte electrónico a tiempo 0 por CS	ET _o /CS	= (ET _o /RC)(RC/ABS)
Densidad de RC por CS	RC/CS	= (ABS/CS)(RC/ABS)
Eficiencias cuánticas (relaciones de flujo)		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	ϕ_{p_0}	= TR _o /ABS = (F _m -F _o)/F _m = 1-(F _o /F _m) = F _v /F _m
Producto cuántico máximo de disminución de excitación fotoquímica	ϕ_{D_0}	= DI _o /ABS = 1- ϕ_{p_0} = F _o /F _m
Probabilidad con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de Q _A ⁻	ψ_0	= ET _o /TR _o = 1-V _j
Probabilidad de un fotón absorbido mueva un electrón después de Q _A ⁻	ϕ_{E_0}	= $\phi_{p_0} - \psi_0$ = (TR _o /ABS)/(ET _o /TR _o) = ET _o /ABS = (1-F _o /F _m)(1-V _j)
Índices de vitalidad		
Índice de potencial fotosintético	PI _{abs}	= [RC/ABS][$\phi_{p_0}/(1-\phi_{p_0})$][$\psi_0/(1-\psi_0)$]
Fuerza motriz de la fotosíntesis	DF _{abs}	= Log [PI _{abs}]

Tabla IV.2. Formulación y definición de parámetros del test JIP (Strasser *et al.*, 2000).

Las formulas en relación a los flujos de energía específicos (por centro de reacción) y fenomenológicos (por sección transversal excitada, CS, o área foliar), así como los ratios de flujo o rendimientos, junto con los valores experimentales del test JIP, han sido derivados en base a la teoría del flujo de energía (Strasser y Strasser, 1995; Strasser *et al.*, 2000; Strasser *et al.*, 2004), tal y como se muestra a continuación:

La expresión clave del test JIP es TR_0/RC , el flujo de captura específico a tiempo cero. A cualquier otro tiempo, TR/RC expresa la tasa por la cual un excitón es capturado por el centro de reacción dando como resultado la reducción de Q_A a Q_A^- . El valor máximo de esta tasa viene dado por TR_0/RC , debido a que a tiempo cero todos los centros de reacción están abiertos. Si la reoxidación de Q_A estuviese bloqueada, como sucede en muestras tratadas con DCMU, TR_0/RC vendría dado por la normalización de la pendiente inicial de la curva de inducción de fluorescencia (medida entre 50 y 300 ms) sobre la máxima fluorescencia variable $F_v = F_m - F_0$. Este valor normalizado es designado como $M_{0, DCMU}$. Sin embargo, debido a que la reoxidación de Q_A no está bloqueada *in vivo*, el valor normalizado de la pendiente inicial, M_0 , expresa la tasa neta de centros de reacción cerrados, donde la captura aumenta el número de centros cerrados y el transporte electrónico lo disminuye:

$$M_0 = TR_0 / RC - ET_0 / RC \quad (\text{ec. 1})$$

La exhaustiva investigación llevada a cabo por el profesor Strasser de la Universidad de Ginebra (Strasser y Strasser, 1995), reveló que la fase O-J, normalizada entre 0 y 1, coincide con $V = f(t)$ en muestras tratadas con DCMU.

Por tanto, $M_{0, DCMU}$ puede ser simulado por la amplificación de M_0 medido *in vivo* por un factor recíproco a V_J o, equivalentemente, por la pendiente inicial de $W = f(t)$, donde $W = V/V_J = (F - F_0)/(F_J - F_0)$ (ec. 2)

Por tanto, el flujo máximo de captura queda descrito como:

$$TR_0/RC = M_{0, DCMU} = M_0/V_J = (dW/dt)_0 \quad (\text{ec. 3})$$

Las ecuaciones ec. 1 y 3, dan el flujo máximo específico para el transporte electrónico más allá de Q_A^- :

$$ET_0/RC = TR_0/RC - M_0 = (TR_0/RC) \cdot (1 - V_J) \quad (\text{ec. 4})$$

De esta forma, la probabilidad de que un excitón capturado mueva un electrón en la cadena de transporte electrónico más allá de Q_A , viene dado por:

$$\psi_0 = ET_0/TR_0 = 1 - V_J \quad (\text{ec. 5})$$

Debido a que el rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria es:

$$\phi_{P_0} = TR_0/ABS = 1 - (F_0/F_m) \quad (\text{ec. 6})$$

tenemos que el rendimiento máximo del transporte electrónico es:

$$\varphi_{E_0} = ET_0/ABS = (TR_0/ABS) \cdot (ET_0/TR_0) = \varphi_{P_0} \cdot \psi_0 = [1 - (F_0/F_m)] \cdot (1-V_J) \quad (\text{ec. 7})$$

Combinando las ecuaciones ecs. 3 y 6 nos da la medida de la media de absorción por centro de reacción (ABS/RC) y, de forma simultánea, el tamaño aparente de la antena, es decir, la cantidad de clorofilas que absorben por centro de reacción activo:

$$ABS/RC = (TR_0/RC)/(TR_0/ABS) = (TR_0/RC)/\varphi_{P_0} = (M_0/V_J) / [1 - (F_0/F_m)] \quad (\text{ec. 8})$$

La disipación por centro de reacción (DI_0/RC) describe el ratio de la disipación total de la energía de excitación no atrapada de todos los centros de reacción con respecto al número total de CR activos (Strasser et al. 2000). La disipación puede producirse como calor, fluorescencia o transferencia de energía a otros sistemas (Strasser et al. 2000). DI_0/RC se calcula de restar al tamaño máximo efectivo de la antena, la tasa máxima de captura: $DI_0/RC = [(ABS/RC) - (TR_0/RC)]$

La union entre los flujos específicos y los fenomenológicos es la concentración de centros de reacción (o la densidad) por sección transversal excitada de las muestras, RC/CS , que viene dado por:

$$RC/CS = (ABS/CS) / (ABS/RC) \quad (\text{ec. 9})$$

Una vez que ABS/CS es accessible experimentalmente, se calcula RC/CS y el conjunto de flujos fenomenológicos son:

$$ABS/CS = \text{tal como se mide} \quad (\text{ec. 10})$$

$$TR_0/CS = (TR_0/RC) (RC/CS) \quad (\text{ec. 11})$$

$$ET_0/CS = (ET_0/RC) (RC/CS) \quad (\text{ec. 12})$$

El valor de ABS/CS está determinado experimentalmente, siendo una medida de Chl/CS , en cuyo caso se designa como ABS/CS_{Chl} . Si esto no es posible, (como ocurre en experimentos de campo), puede ser aproximado mediante la ecuación:

$$ABS/CS_0 = F_0 \quad \text{o} \quad ABS/CS_m = F_m \quad (\text{ec. 13})$$

El criterio para la elección (se usan los subíndices “0” y “m” para hacer la distinción) es cual de los rendimientos φ_{F_0} o φ_{F_m} no se ven afectados por las diferencias conformacionales o estado de las muestras para ser comparados. Al mismo tiempo:

$$TR_0/CS_0 = [1 - (F_0/F_m)] \cdot F_0 \quad \text{o} \quad TR_0/CS_m = [1 - (F_0/F_m)] \cdot F_m \quad (\text{ec. 14})$$

$$ET_0/CS_0 = [1 - (F_0/F_m)] \cdot (1-V_J) \cdot F_0 \quad \text{o} \quad ET_0/CS_m = [1 - (F_0/F_m)] \cdot (1-V_J) \cdot F_m \quad (\text{eq. 15})$$

Otro parámetro importante a considerar en el test JIP son los centros de reacción silenciosos o también llamados centros no reductores de Q_A .

Este tipo de centros aparecen en situaciones de estrés y son centros de reacción que no puede ni reducir Q_A ni transferir su energía de excitación de vuelta a la antena y por tanto no contribuyen a la fluorescencia variable. Su rendimiento de fluorescencia permanece constantemente bajo e igual a los CR abiertos; por otra parte, son rápidamente reactivados tan pronto como cesa el estrés que provocó su transformación cesa.

Mientras que F_v/F_m se refiere a la muestra completa, y por lo tanto, es un valor medio, TR_0/ABS total, el flujo de captura TR_0/RC debería leerse como TR_0/RC activo.

Esto es debido a que es calculado solo a partir de la cinética de la fluorescencia variable y se refiere solamente a aquellos centros de reacción (fotosintéticamente activos) que pueden reducir Q_A . Por tanto, el incremento de ABS/RC o, más correctamente, ABS_{total}/RC_{activo} , no significa un incremento en el tamaño estructural de la antena de un complejo bioquímico, sino un incremento aparente de la antena económica, de la absorción total dividida por los centros de reacción activos.

Utilizando los parámetros del test JIP, es fácil de calcular (Strasser y Tsimilli-Michael 1998) qué fracción de centros de reacción que estaban activos en el estado control (sin estrés), permanecen activos después del estrés, y de igual forma, cual es la fracción de centros de reacción silenciosos transformados:

$$\frac{RC_{si}}{(RC_{activo})_c} = 1 - \frac{(M_0 / V_J)_c [1 - (F_0 / F_M)]}{(M_0 / V_J) [1 - (F_0 / F_M)_c]}$$

Para las curvas de saturación luminosa se empleó un fluorímetro PAM-2000 (Walz, Effeltrich, Alemania). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente en plantas con tallos de entre 5-10 cm de altura y sobre hojas maduras de la roseta. La fluorescencia mínima (F_0) se obtuvo después de la excitación de la muestra con un débil rayo de medición de un diodo emisor de luz ($10 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Se determinó el transporte electrónico fotosintético (ETR) y la eficacia fotosintética efectiva del fotosistema II (Φ_{PSII}) frente a un gradiente de intensidad luminosa (0, 40, 80, 160, 320, 640, 1000, 1200, 1500 y 2000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

La eficacia fotosintética efectiva del fotosistema II (Φ_{PSII}) se calculó como $(F_m - F_t)/F_m'$, donde F_t es el nivel de fluorescencia durante la iluminación actínica y F_m' el máximo relativo de fluorescencia que se obtiene tras aplicar un pulso de luz saturante ($3000 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de 1s de duración en condiciones de iluminación (Kramer *et al.*, 2004).

El transporte electrónico fotosintético (ETR) se calculó como $\text{ETR } (\mu\text{mol electrones m}^{-2}\text{s}^{-1}) = \Phi_{PSII} \times \text{PAR incidente } (\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}) \times 0,42$, donde el factor 0,42 corresponde a la proporción de fotones (aproximadamente 0,84) absorbidos por la hoja/(2 fotones/electrón).

IV.1.13 Estudio de la fotosíntesis mediante el empleo de un sistema analizador de gases en el infrarrojo (IRGA)

La tasa de asimilación de CO_2 (A), concentración de CO_2 intercelular (C_i), conductancia estomática (gs) y tasa de transpiración (E) fueron medidas mediante el empleo de un equipo IRGA (analizador de gases en el infrarrojo) Lc Pro+ (ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK), utilizando una cámara de medida de $6,25 \text{ cm}^2$, flujo de aire de $200 \mu\text{mol s}^{-1}$, resistencia límite al vapor de agua (rb) 0,17, factor de conversión de la energía (Hfac) 0,168 y factor de transmisión de la ventana de la cámara 0,870, según las especificaciones del fabricante. Se empleó la unidad de iluminación controlada del aparato. Esta unidad puede alcanzar intensidades de hasta $2000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Las mediciones se realizaron en condiciones ambiente de $22^\circ\text{C} \pm 2$, humedad relativa $15\% \pm 2$ en plantas previamente adaptadas a la oscuridad durante al menos 15 minutos y se utilizaron al menos 10 plantas por cada línea mutante y Col-0 para las mediciones.

En un primer conjunto de ensayos se expusieron las plantas a intensidades luminosas crecientes (0, 40, 80, 160, 320, 640, 1000, 1200, 1500 y $2000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante 5 minutos cada intensidad y CO_2 400 ppm.

En el segundo tipo de ensayos se expusieron las plantas durante 15 minutos a luz constante ($100 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y CO_2 400 ppm.

Un tercer tipo de ensayos consistió en exponer las plantas a concentraciones saturantes de CO₂ (1000 ppm), luz constante (100 μmol fotones m⁻² s⁻¹) y CO₂ 400 ppm. Los parámetros medidos y/o calculados por el aparato, así como su formulación se detallan a continuación:

- **Tasa de asimilación fotosintética: A (μmol m⁻²s⁻¹)**

$$A = u_s \Delta c$$

donde:

u_s es el flujo de masa de aire por m² de área foliar, mol m⁻² s⁻¹

Δc es la diferencia en la concentración de CO₂ a través de la cámara, dilución corregida, μmol mol⁻¹.

- **Tasa de transpiración: E (mol m⁻²s⁻¹)**

$$E = \frac{\Delta e u_s}{p}$$

donde:

Δe es la concentración de vapor de agua diferencial, mbar, dilución corregida.

u_s es el flujo de masa de aire por m² de área foliar, mol m⁻² s⁻¹;

p es la presión atmosférica, mBar

- **CO₂ intercelular: C_i (μmol mol⁻¹), según von Caemmerer y Farquhar (1981)**

$$C_i = \frac{\left(\left(g_c - \frac{E}{2} \right) C'_{an} \right) - A}{g_c + \frac{E}{2}}$$

donde:

$$g_c = \frac{1}{1,6r_s + 1,37r_b}$$

C'_{an} es el CO₂ que fluye hacia afuera desde la cámara de la hoja, μmol mol⁻¹, dilución corregida.

E es la tasa de transpiración, mol m⁻²s⁻¹

A es la tasa fotosintética de intercambio de CO₂ en la cámara de la hoja, $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

r_b es la resistencia de la capa límite al vapor de agua, $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{mol}^{-1}$

r_s es la resistencia estomática al vapor de agua, $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{mol}^{-1}$

- **Conductancia estomática al CO₂:** $\text{gs} (\text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{mol}^{-1})$, según von Caemmerer y Farquhar (1981)

$$\text{gs} = \frac{A}{(C_a - C_i)}$$

donde:

A es la tasa fotosintética de intercambio de CO₂ en la cámara de la hoja, $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

C_i es el CO₂ intercelular, $\mu\text{mol mol}^{-1}$

C'_{an} es el CO₂ que fluye hacia afuera desde la cámara de la hoja, $\mu\text{mol mol}^{-1}$, dilución corregida.

- **Eficiencia en el uso del agua:** A/E , según Fisher y Turner (1978).

IV.1.14 Tratamientos de inducción de estrés fotooxidativo

Los tratamientos de inducción de estrés fotooxidativo para las medidas de intercambio gaseoso (IRGA) y fluorescencia (test JIP) se realizaron mediante pulverizaciones de 20 μM metil viológeno (MV en adelante, 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, Sigma, Madrid, España) + 0,1% Tween (Merck Millipore, Madrid, España). El MV se aplicó 12 horas antes de las mediciones para asegurar su penetración, y manteniendo a las plantas en oscuridad hasta el comienzo de las mediciones. El MV es un herbicida no selectivo de uso común, más conocido como paraquat, que actúa interfiriendo el transporte electrónico fotosintético a nivel del PSI, tomando electrones de proteínas con complejos ferrosulfurados y transfiriéndolos a oxígeno molecular para formar radical superóxido (O_2^-). En esta reacción el MV es regenerado y puede volver a actuar. (Ekkehard y Stitt, 1989; Moustaka y Moustakas, 2014). El superóxido es un radical libre que reacciona inespecíficamente con un amplio

rango de moléculas en el cloroplasto, conduciendo a una rápida pérdida de actividad en el mismo (Fridovich, 1997).

En las pruebas de respuesta frente a estrés producido por metil viológeno (MV) medidas con el equipo IRGA, se aplicaron tres iluminaciones crecientes (50, 200 y 2000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 4 minutos cada una y CO_2 400 ppm, a plantas tratadas con MV (20 μM + 0,1% Tween) y plantas control.

Las pruebas de respuesta frente a estrés producido por metil viológeno (MV) en las que se llevaron a cabo medidas de fluorescencia, fueron realizadas de la misma forma que se ha explicado en la sección IV.1.12 de materiales y métodos.

IV.1.15 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete de software SPSS para Windows (versión 21) utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) con el test de Tukey. Los resultados presentados en los diferentes resultados corresponden a la media \pm la desviación estándar y considerando las diferencias significativas a un nivel $p < 0,05$. Se emplearon al menos 15 réplicas de cada tipo de planta en cada ensayo.

IV.2 Resultados

IV.2.1 Selección de mutantes de *A. thaliana* noqueados en los genes de peroxidasa 52 y 72.

IV.2.1.1 Búsqueda en las diferentes colecciones de mutantes de *Arabidopsis* generados por insertos aleatorios de T-DNA

Partiendo de las dos peroxidasa que se han tomado como candidatas a estar implicadas en procesos de lignificación igual que ZePrx, AtPrx52 y AtPrx72, el primer paso fue la búsqueda de individuos mutantes noqueados para cada una de ellas. Para ello se siguieron los siguientes criterios de selección:

- 1) Se elaboró una lista completa de todos los mutantes existentes de cada una de las peroxidasa. Se decidió utilizar en primer lugar los mutantes encontrados en la base de datos de mutantes homocigóticos denominada SALK Homozygotes (ver materiales y métodos)
- 2) Se seleccionaron los mutantes atendiendo a los siguientes criterios, con el fin de elegir dos líneas de cada una de las peroxidasa de interés:
 1. Se buscó que la mutación estuviese preferentemente cerca del ATG y a ser posible entre las dos histidinas características de estas peroxidasa, entre las cuales se localiza el centro de reacción. Cualquier mutación en esta posición afectaría indudablemente al funcionamiento del enzima.
 2. Se buscó que tuviese buena disponibilidad en el NASC (The European Arabidopsis Stock Centre) o en el ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) para su adquisición ya que es primordial disponer de este material para avanzar en el estudio.

La razón por la cual se seleccionaron dos mutantes de cada peroxidasa fue la de evaluar si ambos mutantes se comportaban de forma similar. Debido a que la posición de la inserción puede tener un mayor o menor efecto en la mutación, una vez analizados los dos mutantes de cada peroxidasa se escogerá para trabajar aquel que presente mayores diferencias en relación a la variedad silvestre Col-0.

IV.2.1.2 Elección de mutantes

Para AtPrx52 tan sólo había dos mutantes que cumplieren los requisitos anteriormente mencionados: SALK_081257.50.70.x y SM_3_1699.

Se adquirieron semillas de ambos en el NASC (ver materiales y métodos). La línea Salk 081257.50.70.x procedente del Salk Institute posee la inserción en el primer exón entre el ATG y la histidina proximal por lo que es muy factible que tenga anulada su función. La línea SM_3_1699 procedente del JIC (John Innes Center) contiene un transposon simple (Spm) defectuoso (dSpm) como inserción estable en el genoma. La inserción se encuentra en el primer exón entre el ATG y la histidina proximal al igual que la línea SALK_081257.50.70.x.

El resto de mutantes de la base de datos no estaban disponibles, o no cumplían los criterios establecidos o no estaban confirmados. En este último caso, una línea no confirmada es aquella que nadie ha podido constatar mediante PCR que ese mutante posea la inserción donde asegura tenerla. Por este motivo, dado que la incertidumbre de que ese mutante no funcione era muy alta, se decidió descartarlos.

En el caso de AtPrx72 se escogieron la línea Sail_891_H09 (Syngenta) cuya inserción está situada en un intrón entre las dos histidinas. Y la línea Salk_136893.44.70.x que está descrito en la base de datos como homocigoto *knock-out* y tiene una mayor disponibilidad en los bancos de semillas.

IV.2.1.3 Selección de mutantes y cultivo.

Una vez obtenidas las semillas, se realizó la selección e identificación de mutantes homocigotos de la peroxidasa 52 y 72 de *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se ha utilizado el cultivo de semillas en medio MS con agentes selectivos y posterior testado mediante PCR y electroforesis en geles de agarosa (ver materiales y métodos).

En primer lugar se realizó la vernalización de las semillas y posterior cultivo en presencia de kanamicina (un antibiótico) o Pestanal[®] (un herbicida) según el tipo de mutante (figura IV.4).

Los individuos seleccionados se testaron mediante PCR y electroforesis en geles de agarosa que proporcionan la identificación de los individuos heterocigotos, homocigotos y variedad silvestre (WT, wild type en inglés) por el patrón de bandas que

genera. Con ayuda de individuos de la variedad silvestre Col-0 se pudo identificar el tipo de mutante seleccionado.

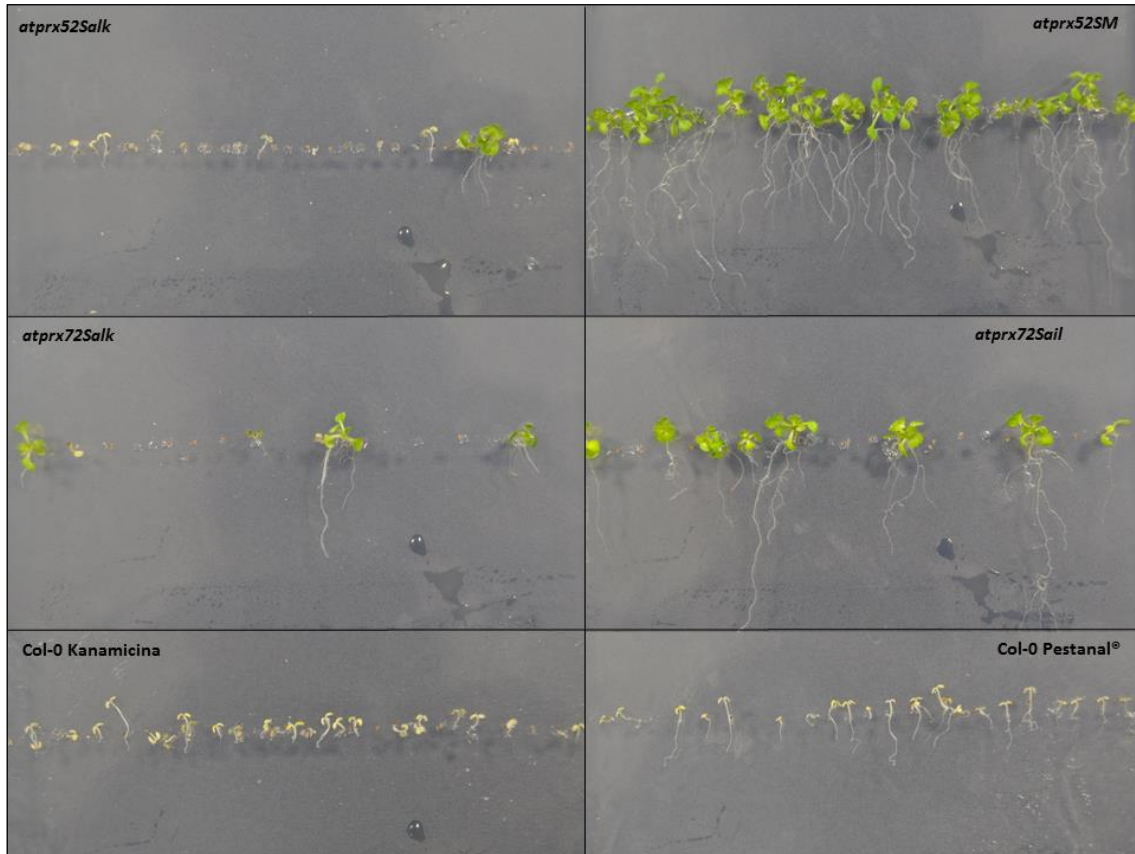


Figura IV.4. Selección de individuos mutantes en medio MS con Kanamicina (para las líneas Salk) y Pestanal[®] (para las líneas Sail y SM).

IV.2.1.4 Testado mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa

Las semillas de cada línea mutante se crecieron en medio de cultivo MS y el agente seleccionante de cada tipo de mutante. Los mutantes de la línea Salk (tanto para peroxidasa 52 como 72) poseen un gen de resistencia a kanamicina, mientras que los mutantes de las líneas Sail y SM poseen un gen de resistencia al herbicida Pestanal[®] (ver materiales y métodos).

Los individuos capaces de crecer en el medio de selección fueron trasplantados a macetas individuales con tierra, marcados y numerados, e incubados en cámara de cultivo en condiciones controladas: 12 horas de luz a 24°C y 12 horas de oscuridad a 22°C.

Cuando los individuos disponían del segundo par de hojas adultas, se utilizaron éstas para extraer el DNA, cuantificarlo, y posteriormente mediante el empleo de cebadores (primers) amplificar la región de interés mediante PCR.

El diseño de los cebadores para las líneas mutantes Salk y Sail se realizó de forma automática en la base de datos del Salk Institute (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) y los cebadores para la línea SM se realizó según el protocolo proporcionado por el John Innes Centre (www.jic.ac.uk) mediante el empleo de la herramienta Primer3 (ver materiales y métodos).

Los resultados del crecimiento en medio selectivo de las líneas mutantes se muestra en la figura IV.4. Sólo los individuos con el gen de resistencia al agente selectivo sobrevivieron pudiendo observarse numerosas “bajas” producidas bien durante la germinación o durante el desarrollo de los cotiledones (los cuales aparecen etiolados).

La presencia de todos los individuos Col-0 con los cotiledones etiolados tanto en medio con kanamicina como con Pestanal[®] indica que el agente selectivo y la concentración del mismo funcionaron correctamente.

Aquellos individuos que crecieron de forma óptima en placa con agente selectivo fueron trasplantados a tiestos individuales con tierra e incubados en cámara de cultivo. De cada plántula trasplantada a tierra se extrajo DNA de su segundo par de hojas, se cuantificó y se realizaron las PCR de las líneas *atprx72* Salk y Sail, y *atPrx52* Salk y SM (ver materiales y métodos).

El patrón de bandas para determinar si una línea es mutante o no según los protocolos del Salk Institute se muestra en la figura IV.5. Los resultados de la amplificación y posterior electroforesis se muestran en las figuras IV.6 y IV.7.

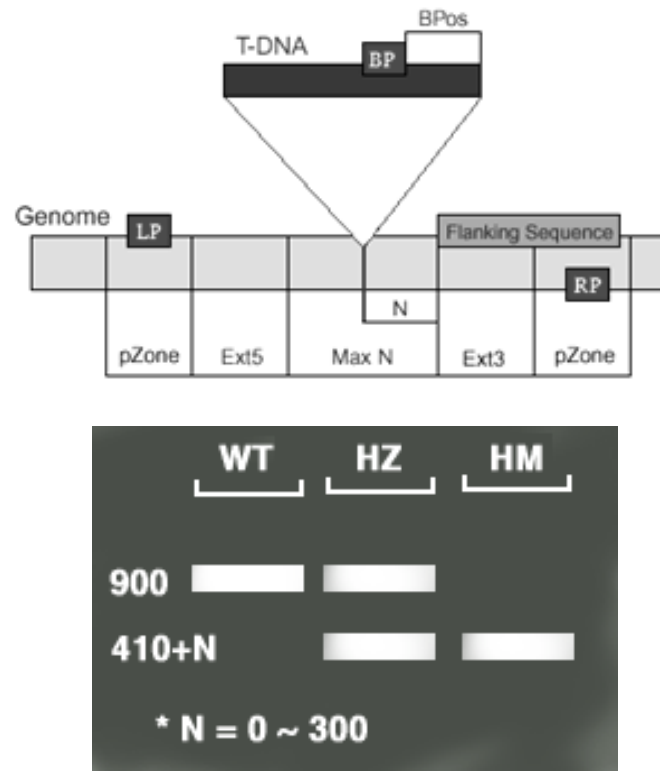


Figura IV.5. Esquema del diseño y funcionamiento del testado de individuos mutantes. WT: variedad silvestre; HZ: individuo heterocigoto; HM: individuo homocigoto. LP: cebador izquierdo; RP: cebador derecho; BP: cebador de borde o del T-DNA. Tomado de: Salk T-DNA primer design (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

En base al esquema de la figura IV.5, los individuos silvestres mostrarán una banda en torno a los 900-1100 pb tal y como sucedió con los individuos silvestres Col-0 de los experimentos (figuras IV.6, IV.7)

Los individuos heterocigotos mostraban dos bandas, una en los 900-1100 pb y otra en torno a los 700 pb (410 ± 300) (figuras IV.6, IV.7). Por último, los homocigotos presentan una única banda en torno a los 700 pb (figuras IV.6, IV.7).

Se observaba un ligero desfase entre las bandas de los mutantes Sail, SM y Salk, que es debida a las diferencias en la posición de los cebadores respecto del inserto, y a que cada línea mutante tiene un tamaño de inserto diferente (figuras IV.6, IV.7).

De los individuos homocigotos se obtuvieron semillas que se cultivaron hasta la tercera generación con la que se empezaron el resto de experimentos.

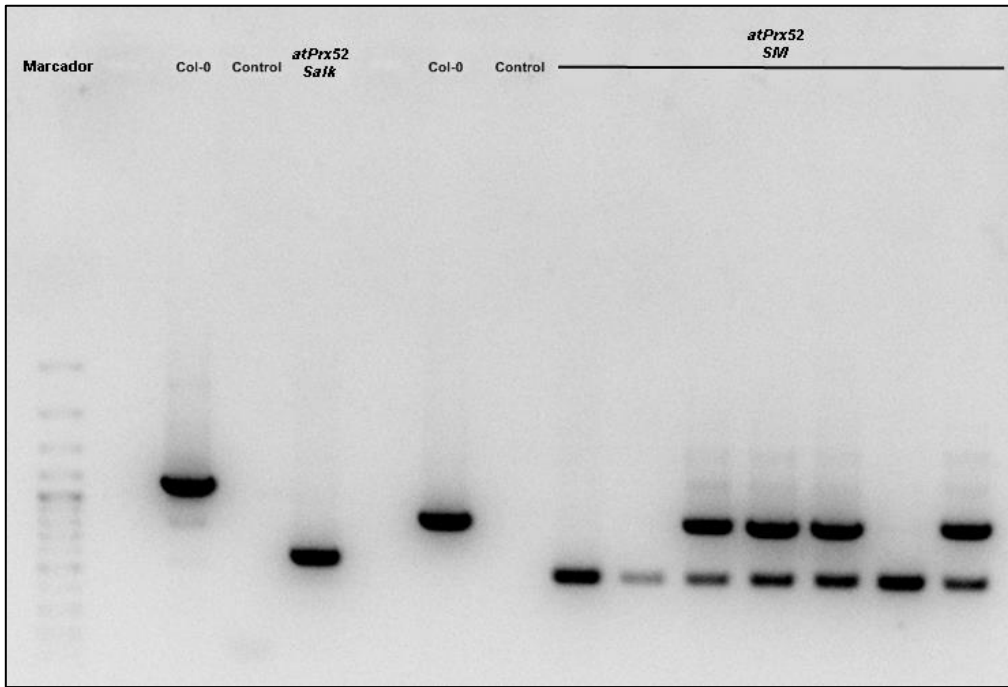


Figura IV.6. Patrón electroforético de las líneas mutantes de la peroxidasa 52 (Salk y SM). Se pueden observar individuos mutantes homocigóticos (con una banda por debajo de Col-0) e individuos heterocigóticos (con dos bandas, una correspondiente al alelo silvestre y otra al alelo mutante).

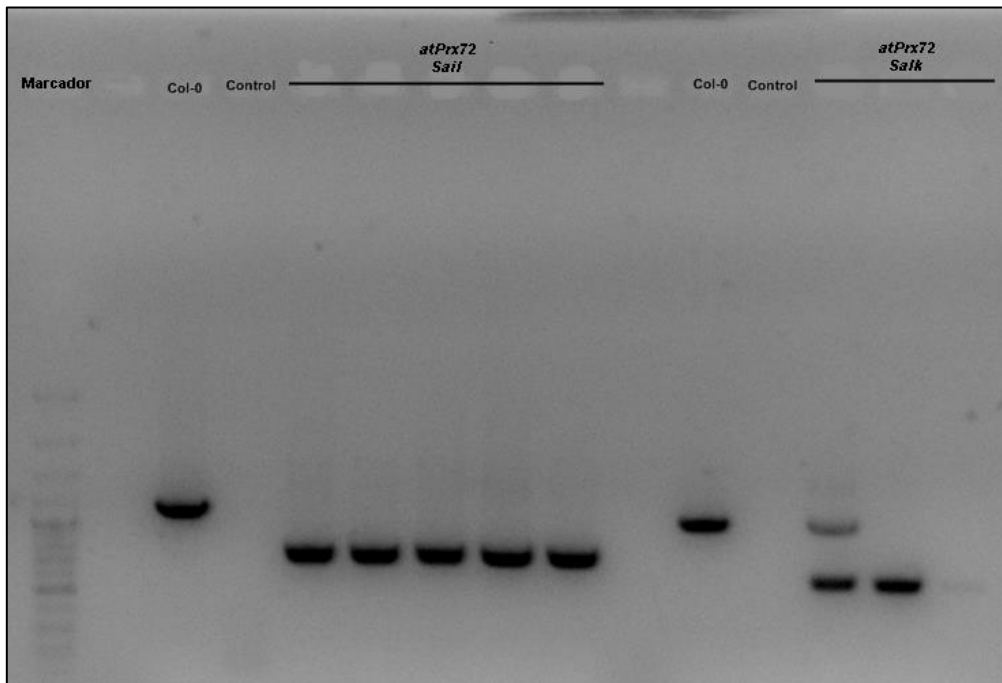


Figura IV.7. Patrón electroforético de las líneas mutantes de la peroxidasa 72 (Salk y Sail). Se pueden observar individuos mutantes homocigóticos (con una banda por debajo de Col-0) e individuos heterocigóticos (con dos bandas, una correspondiente al alelo silvestre y otra al alelo mutante).

IV.2.2 Análisis de los niveles de expresión del gen de peroxidasa en los mutantes homocigóticos mediante el empleo de RT-PCR en tiempo real (*Real Time* RT-PCR o Q-PCR)

La técnica de mutagénesis mediante insertos de T-DNA (DNA de transferencia) ha sido ampliamente utilizada para producir mutantes de inserción en *Arabidopsis thaliana* para la caracterización funcional de cada gen de su genoma (Alonso *et al.*, 2003). Más de 360.000 inserciones han sido asignadas en el genoma de *Arabidopsis*, lo que supone más del 90% de los genes (Alonso y Ecker, 2006). Debido a que las inserciones suelen hacerse como concatámeros, la mayoría de las inserciones de T-DNA producen la pérdida de función de los alelos dando lugar en la mayoría de los casos examinados a la ausencia de la proteína funcional en las plantas mutantes homocigotas. Incluso en el caso de que hubiese transcripción del mRNA, la secuencia del T-DNA puede contener codones de terminación, lo que resulta en la finalización temprana de la traducción (Wang, 2008). Aunque no es una técnica perfecta, la mutagénesis mediante inserción de T-DNA es una poderosa herramienta para vincular genes con fenotipos determinados y descubrir la función de esos genes.

La forma de comprobar el efecto de la inserción de T-DNA es mediante un análisis de la expresión de los genes mutados en mutantes de inserción homocigotos. Pero esto es bastante complicado, como se muestra a continuación en el caso concreto de las AtPrx, debido a que a menudo el nivel de transcrito no se corresponde con el nivel de proteína (Wang, 2008).

Por tanto, a la hora de testar los niveles de expresión de este tipo de mutantes hay que tener en cuenta la posición de los primers en los experimentos de Q-PCR, los cuales se recomienda que estén aguas arriba o aguas abajo del sitio de inserción si este se encuentra en el medio del gen (Wang, 2008).

Según Wang (2008), los cebadores que abarcan todo el inserto no producen ningún resultado, presumiblemente debido a que el inserto de T-DNA es a menudo mayor de 5 kb, y en caso de que fuese transcrito, es demasiado largo para una DNA polimerasa estándar a la hora de amplificar. Y si el T-DNA no se transcribe como una unidad, no es posible normalmente amplificarlo por RT-PCR.

Todos los insertos de T-DNA, excepto el inserto del mutante *atprx52Salk*, poseen señales de stop lo que hace que en caso de producirse la transcripción, no se

traduzca en proteína o si se traduce sería en bajos niveles o como proteína truncada no funcional (Wang, 2008). Sin embargo, a pesar no de poseer señal de stop, el inserto del mutante *atprx52Salk* codifica elevados niveles de prolina (Pro) que desestabilizan a la proteína mutante haciéndola inviable.

No obstante, está documentado que la inserción de un fragmento de T-DNA produce efectos adicionales en el genoma como deleciones y translocaciones interrumpiendo efectivamente la expresión (Wang, 2008).

En este caso de estudio, los cebadores utilizados para el experimento de Q-PCR se situaban en el caso de los mutantes *atprx52Salk* y *atprx52SM*, después del inserto; y en el caso de *atprx72Salk* y *atprx72Sail*, antes del inserto (para más información sobre los cebadores ver materiales y métodos).

Los resultados del experimento de Q-PCR se muestran en la tabla IV.3. Se detectó señal de amplificación en todos los mutantes, y por tanto existió transcripción. No obstante, los transcritos estaban truncados debido a la inserción.

La lectura de los resultados de Q-PCR se hizo atendiendo a los niveles de expresión de peroxidasa 72 que tuvieron los mutantes de peroxidasa 52, y viceversa.

Los resultados mostraron que los mutantes de peroxidasa 52 poseen elevados niveles de expresión de peroxidasa 72. En cambio, en los mutantes de peroxidasa 72 no hubo incremento de la expresión de peroxidasa 52.

Transcrito	Nivel de expresión comparado con Col-0 (tanto por 1 respecto del control \pm DE)				
	Col-0	Knockout- <i>atprx52Salk</i>	Knockout- <i>atprx52SM</i>	Knockout- <i>atprx72Salk</i>	Knockout- <i>atprx72Sail</i>
<i>atprx52</i>	1 \pm 0,18	1,60 \pm 0,39	1,97 \pm 0,56	1,30 \pm 0,94	1,16 \pm 0,7
<i>atprx72</i>	1 \pm 1,47	23,38\pm5,23	33,82\pm4,39	1,63 \pm 0,69	0,98 \pm 0,56

Tabla IV.3. Niveles de expresión de los diferentes transcritos de peroxidasa en plantas silvestres (Col-0) y en mutantes *knock-out* de peroxidasa (52 y 72). Los resultados están expresados como número de veces que se expresa el gen en el mutante con respecto al Col-0 (variedad silvestre) en tanto por uno. Los datos son la media \pm DE. Se realizaron 2 Q-PCR independientes utilizando para cada una de ellas al menos 3 plantas distintas de cada línea mutante y Col-0 y por duplicado. Los valores estadísticamente significativos ($P < 0,05$) con respecto a Col-0 están marcados en negrita. DE: desviación estándar.

Como se dijo anteriormente, la razón de escoger dos mutantes de cada peroxidasa era poder comprobar si ambos mutantes de la misma enzima se comportaban de forma similar y los resultados eran reproducibles. Con el objeto de ver mejor las diferencias que presentan estos individuos con respecto a la variedad silvestre Col-0, de aquí en adelante se mostrarán sólo los resultados de los mutantes que han presentado diferencias más notables.

Los dos mutantes de cada línea se comportaron de forma similar en todos los experimentos que se describen a continuación, siendo *atprx52Salk* y *atprx72Salk* los mutantes que presentaron las diferencias más notables con respecto a la variedad silvestre (Col-0). *atprx52SM* y *atprx72Sail* no presentan diferencias significativas con respecto a *atprx52Salk* y *atprx72Salk* respectivamente y los resultados no serán mostrados para simplificar y facilitar el seguimiento de esta memoria.

IV.2.3 Caracterización biométrica de los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis* versus la variedad silvestre

Se realizaron análisis biométricos de todos los mutantes en comparación con la variedad silvestre (Col-0). Normalmente, en mutaciones que afectan a un solo gen, las diferencias fenotípicas son pequeñas respecto al tipo silvestre y las metodologías tradicionales son incapaces de detectarlas. Por ello, se utilizó una versión ligeramente modificada de la metodología descrita por Boyes *et al.* (2001) (ver materiales y métodos IV.1.4) para resaltar las diferencias entre los mutantes y las plantas control (Col-0).

Los resultados mostraron que todas las plantas mutantes crecían más despacio que la variedad silvestre y mostraban una morfología de la hoja ligeramente alterada en algunos casos, especialmente en los estadios iniciales de *atprx72Salk* (figura IV.8).

Durante el ciclo de vida de los mutantes, el número de ramas, así como el número de tallos principales (aquellos que surgen de la base de la roseta) divergen significativamente (figuras IV.9A, B y IV.10A, B). En el mutante *atprx52Salk* se observó una mayor producción de tallos principales respecto a Col-0 (figura IV.9A) pero en cambio hubo una disminución importante en el número de ramas laterales que cada uno de estos tallos generaba (figura IV.9B).

Sin embargo, este comportamiento no se cumple en el mutante *atprx72Salk*, donde las diferencias con respecto al silvestre se extendieron no sólo a una menor producción de ramas laterales, sino también a una menor producción de tallos (figura IV.10A, B) (Herrero *et al.*, 2013b)

La roseta también se vio afectada con un menor área y radio foliar en ambos mutantes, al igual que la altura del tallo principal (figuras IV.9D, E, F y IV.10D, E, F). Sin embargo, las diferencias iniciales de los mutantes con respecto al Col-0 se van reduciendo a lo largo del tiempo, siendo característico que a partir del día 34 tras la siembra se produce una recuperación en el desarrollo de los mutantes de forma que al final de su ciclo de crecimiento, las plantas mutantes alcanzan valores de los caracteres estudiados similares a los de la variedad silvestre (Col-0).



Figura IV.8. Diferencias fenotípicas entre plantas de la variedad silvestre (Col-0) y plantas mutantes de las peroxidasa 52 y 72 con 28 días de edad, cuando las diferencias fenotípicas son mayores (ver figuras IV.9 y IV.10). Diferencias en el desarrollo vegetativo de cada tipo de planta. Las plantas fueron sembradas el mismo día y crecieron bajo las mismas condiciones climáticas (ver materiales y métodos IV.1.3).

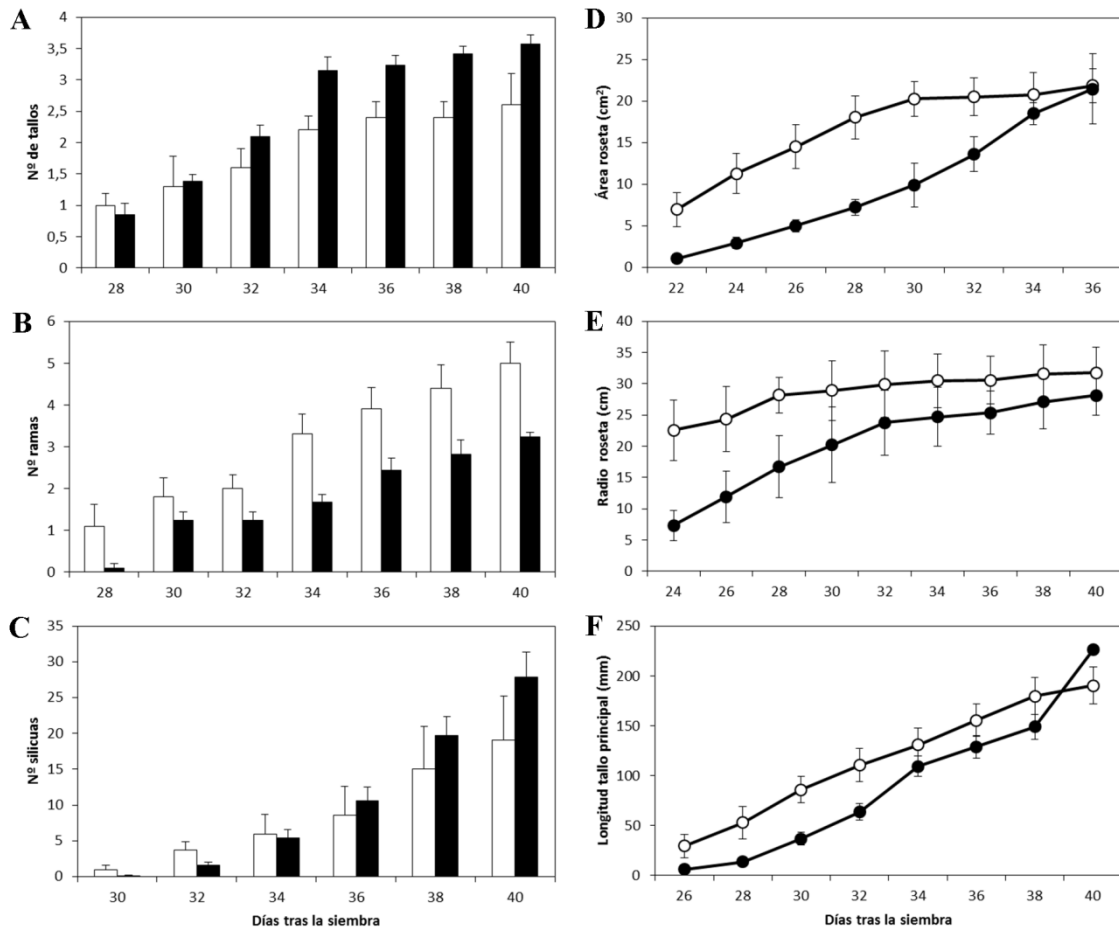


Figura IV.9. Número de tallos principales (A), número de ramas laterales del tallo principal (B), número de silicuas totales (C), área total de la roseta (D), radio mayor de la roseta (E), y longitud del tallo principal (F) analizado en Col-0 (barras y símbolos blancos) y en el mutante *atprx52Salk* (barras y símbolos negros).

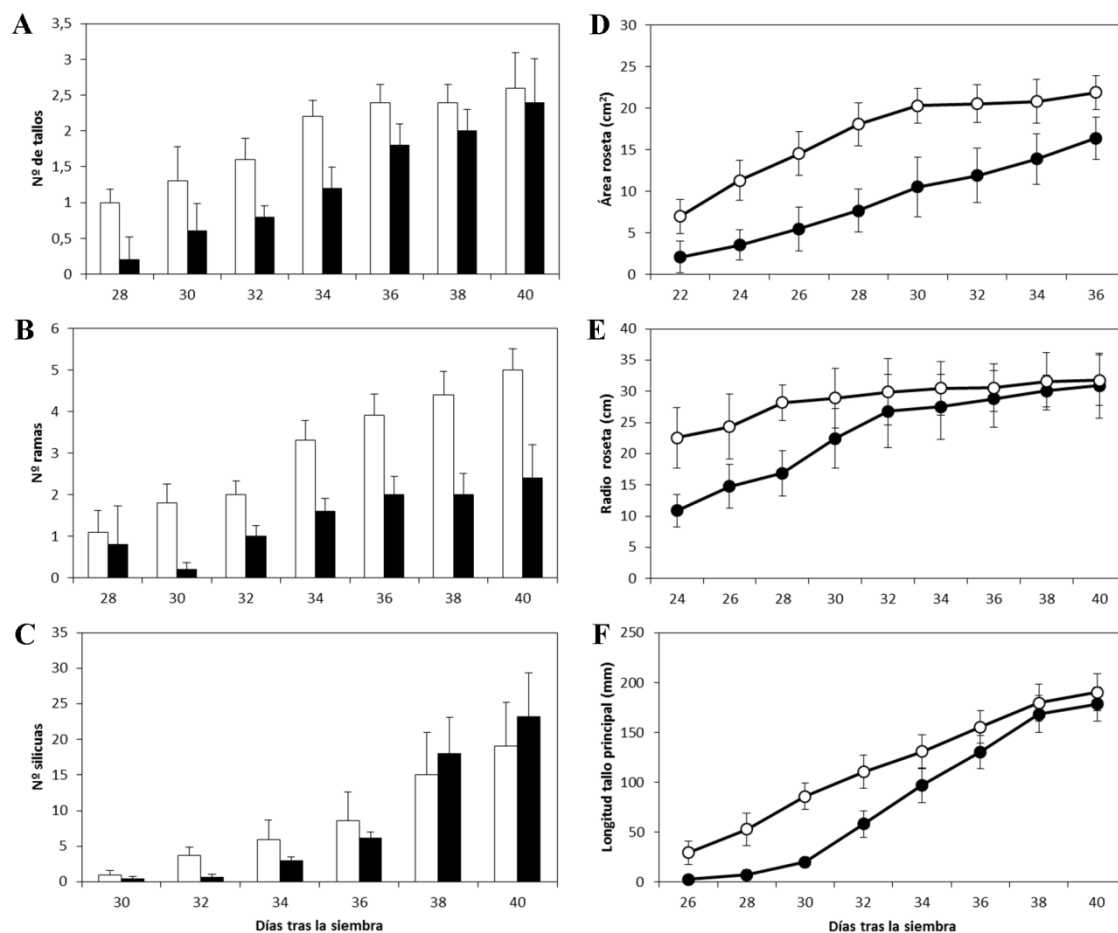


Figura IV.10. Número de tallos principales (A), número de ramas laterales del tallo principal (B), número de silicuas totales (C), área total de la roseta (D), radio mayor de la roseta (E), y longitud del tallo principal (F) analizado en Col-0 (barras y símbolos blancos) y en el mutante *atrpx72Salk* (barras y símbolos negros).

Los mutantes produjeron mayor número promedio de silicuas (figuras IV.9C y IV.10C), aunque la diferencia sólo llegó a ser estadísticamente significativa en *atrpx52Salk*. A pesar de esta mayor producción de silicuas, la viabilidad de las semillas se vió reducida en todos los mutantes. La tasa de germinación se reducía drásticamente desde un 82,6% en Col-0 hasta menos de un 50% en los mutantes 52 y 72 (48,97% y 41,66% respectivamente).

IV.2.4 Estudio de la actividad peroxidasa, contenido de fenoles totales y azúcares solubles en los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis*

IV.2.4.1 Detección de actividad peroxidasa

Se procedió a analizar la actividad peroxidasa de los mutantes de estudio con el fin de detectar diferencias en la actividad total. Dada la redundancia de función que existe entre las peroxidasas, y el elevado número que existen (73 en *Arabidopsis*), el estudio se limitó a observar cambios en la actividad peroxidasa total, sin entrar a analizar las diferentes isoenzimas por su elevada complejidad y porque está fuera de los objetivos de esta Tesis.

Los valores de actividad peroxidasa medidos en planta mostraron diferencias entre las plantas mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk*, y las silvestres (Col-0) (tabla IV.4). A pesar de tener un contenido proteico inferior a la variedad silvestre, *atprx52Salk* posee una actividad específica peroxidasa superior., observándose en la actividad peroxidasa total solo un pequeño descenso respecto a Col-0.

La situación contraria ocurre en el mutante de peroxidasa 72 (tabla IV.4), donde los bajos niveles de proteínas totales coinciden con los bajos niveles de expresión de peroxidasa 52 (tabla IV.3). Respecto a la actividad peroxidasa, tanto expresada en forma de actividad específica como total, es inferior a la de la variedad silvestre y a la del mutante *atprx52Salk*.

	Proteínas (mg/g)	A.E. (nKat/mg proteína)	Actividad total (nKat/g planta)
Col-0	3,345 ±0,052 ^a	2,012±0,087 ^a	14,051
<i>atprx52Salk</i>	2,755 ±0,009 ^b	3,602±0,134 ^b	12,987
<i>atprx72Salk</i>	2,457 ±0,009 ^c	0,783±0,076 ^c	3,586

Tabla IV.4. Contenido proteico y actividad peroxidasa (específica y total) en individuos silvestres y en mutantes de peroxidasa 52 y 72 de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados indican la media ± desviación típica de al menos 4 réplicas. El análisis de la varianza entre las plantas se hizo utilizando el test post-hoc de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas por letras diferentes (p<0,05).

IV.2.4.2 Cuantificación de fenoles solubles totales

El sondeo más inmediato y certero de las consecuencias de la disminución de la síntesis de lignina es la medida del nivel de fenoles solubles totales (flavonoides y otros) en los individuos mutantes, derivados de los intermedios existentes entre la reacción catalizada por PAL y los monolignoles.

Se midieron los fenoles solubles en los individuos mutantes y Col-0. Los resultados obtenidos indican que *atprx72Salk* contenía unas 3,5 veces mayor cantidad de fenoles que *atprx52Salk* y Col-0 (figura IV.11), sin que haya diferencias significativas entre estos dos últimos.

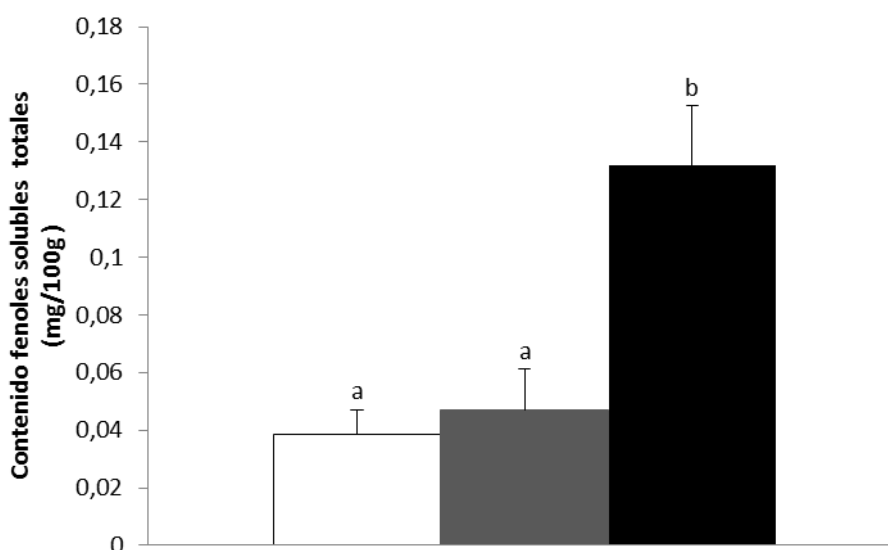


Figura IV.11. Contenido de fenoles totales en individuos silvestres y en mutantes de peroxidasa 52 y 72 de *Arabidopsis thaliana*. Col-0, barra blanca; *atprx52Salk*, barra gris oscuro; *atprx72Salk*, barra negra. El análisis de la varianza entre las plantas se hizo utilizando el test post-hoc de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas por letras diferentes ($p < 0,05$).

IV.2.4.3 Cuantificación de azúcares solubles totales

Debido a que los cambios producidos en el metabolismo secundario, como es la supresión de una enzima de la ruta de síntesis de monolignoles, puede producir cambios en el metabolismo primario (Henkes *et al.*, 2001; Matt *et al.*, 2002; Boerjan *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2004), la cuantificación del contenido en azúcares solubles ofrece

información sobre los cambios que acontecen a nivel del metabolismo primario cuando se suprime la acción de peroxidasas implicadas en procesos de lignificación.

Los resultados mostraron que ambos mutantes tenían un menor contenido de azúcares solubles que Col-0 (figura IV.12), con valores mínimos para *atprx72Salk*.

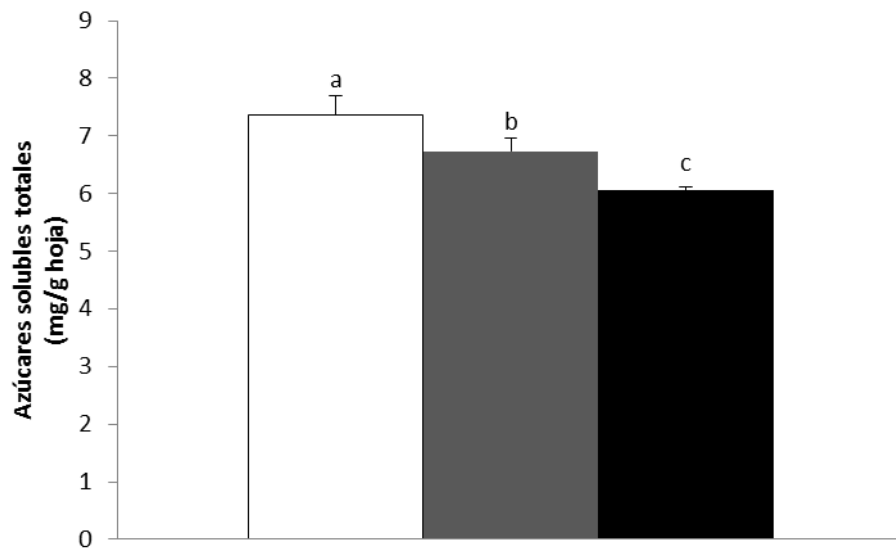


Figura IV.12. Contenido de azúcares totales en individuos silvestres y en mutantes de peroxidasa 52 y 72 de *Arabidopsis thaliana*. Col-0, barra blanca; *atprx52Salk*, barra gris oscuro; *atprx72Salk*, barra negra. El análisis de la varianza entre las plantas se hizo utilizando el test post-hoc de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas por letras diferentes ($p < 0,05$).

IV.2.5 Caracterización de los fenotipos de los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis* en cuanto a su capacidad de fotosíntesis

IV.2.5.1 Estudio de la capacidad de fotosíntesis mediante el análisis de gases con luz infrarroja (IRGA).

Como ya se ha mencionado en la introducción, la biosíntesis de ligninas depende del suministro de carbono proporcionado por la actividad fotosintética y de su posterior partición, regulada metabólicamente.

Por ello se ha medido la tasa de fotosíntesis mediante el empleo del sistema IRGA (Infrared Gas Analysis) LC Pro⁺ (ADC Scientific Ltd., UK) para cada uno de los mutantes (*atprx52Salk* y *atprx72Salk*) y el ecotipo silvestre (Col-0).

Para discernir si existían diferencias en la tasa de asimilación de CO₂ entre los mutantes y el ecotipo silvestre se realizaron varias pruebas de medición de la fotosíntesis. En primer lugar, se comparó la tasa fotosintética a intensidad luminosa constante durante 15 minutos y a concentraciones de CO₂ ambiental (400 ppm) y saturante (1000ppm). En segundo lugar, para determinar el punto de compensación y el de saturación luminosa se realizó una curva de asimilación de CO₂ frente a intensidades crecientes de luz.

Asimilación de CO₂ en los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis*

En todas las medidas de la tasa de asimilación de CO₂ se emplearon plantas previamente adaptadas 15 minutos en oscuridad y a humedad relativa (HR) ambiental (15% ± 2) (ver materiales y métodos). Para determinar el tiempo mínimo necesario para obtener medidas estables se utilizó la misma intensidad luminosa que la empleada para el crecimiento en la cámara de cultivo (~100 μmol fotones m⁻²s⁻¹, ver materiales y métodos) y una concentración de CO₂ constante (400 ppm) similar a la ambiental. En la figura IV.13 A, B se observa que, cuando se empleaban dichas condiciones y tras unos 10 min de exposición luminosa, se alcanzaban valores estables en la tasa de asimilación de CO₂ tanto en Col-0 como en los mutantes. La pendiente inicial de la curva de asimilación de CO₂ era prácticamente similar para Col-0 y *atprx52Salk*; mientras que

para *atprx72Salk* era menor. Asimismo, los valores en el estado de equilibrio eran claramente más bajos para *atprx72Salk*. Empleando concentraciones saturantes de CO₂ (1000 ppm, figura IV.13C) bajo las mismas condiciones de iluminación se observaba que las diferencias entre Col-0 y *atprx52Salk* disminuían y dejaban de ser significativas, pero se mantenían para *atprx72Salk*. También se observó un aumento de la tasa de asimilación de CO₂ de unas 2,5 veces para cada ecotipo.

Para determinar los puntos de compensación y de saturación luminosa se realizaron ensayos aplicando intensidades crecientes de iluminación (0, 40, 80, 160, 320, 640, 1000, 1200, 1500 y 2000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los resultados presentados en la figura IV.14 muestran que la tasa de asimilación de CO₂ era negativa a intensidades bajas de luz, alcanzándose el punto de compensación luminosa en Col-0 a una intensidad de entre 40 y 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que para los mutantes se alcanzaba a una intensidad luminosa algo más baja (menor de 40 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El punto de saturación luminosa se alcanzaba a intensidades de unos 1000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para los tres ecotipos de *Arabidopsis*; pero la tasa máxima de asimilación de CO₂ difería entre ellos, siendo la más alta para Col-0 (aproximadamente 30 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y menores y muy similares para los dos mutantes, siendo la más baja para *atprx72Salk* (aproximadamente 20 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

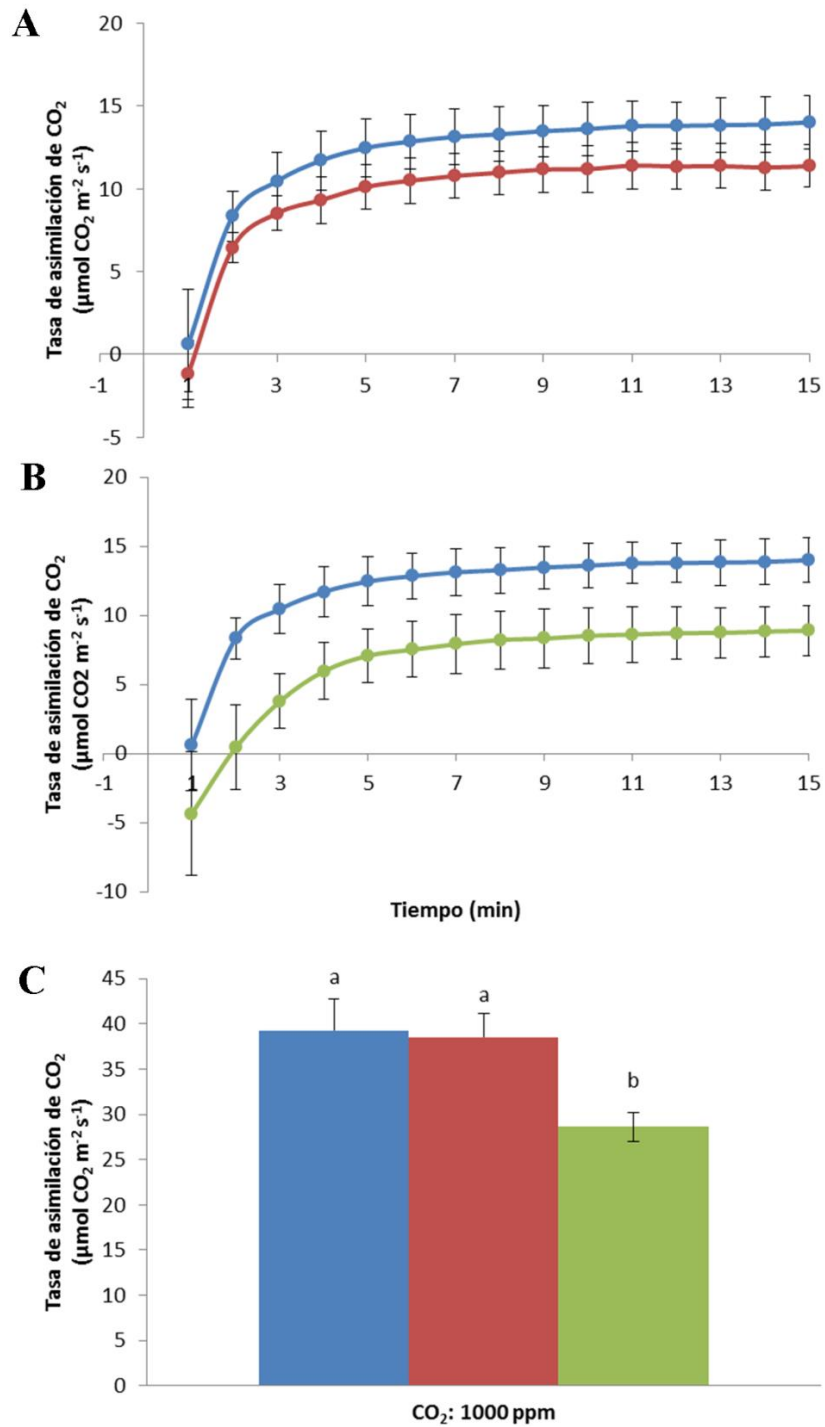


Figura IV.13. A: Evolución de la tasa de asimilación durante 15 min a intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de Col-0 (línea azul) y *atprx52Salk* (línea roja). **B:** Evolución de la tasa de asimilación durante 15 min a intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de Col-0 (línea azul) y *atprx72Salk* (línea verde). **C:** tasa de asimilación, tras 10 min de iluminación (100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en condiciones de CO₂ saturante (1000 ppm). Col-0: barras azules; *atprx52Salk*: barras rojas; *atprx72Salk*: barras verdes. El análisis de la varianza entre las plantas se hizo utilizando el test post-hoc de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas por letras diferentes ($p < 0,05$). Las barras de error representan la desviación típica de al menos 15 réplicas.

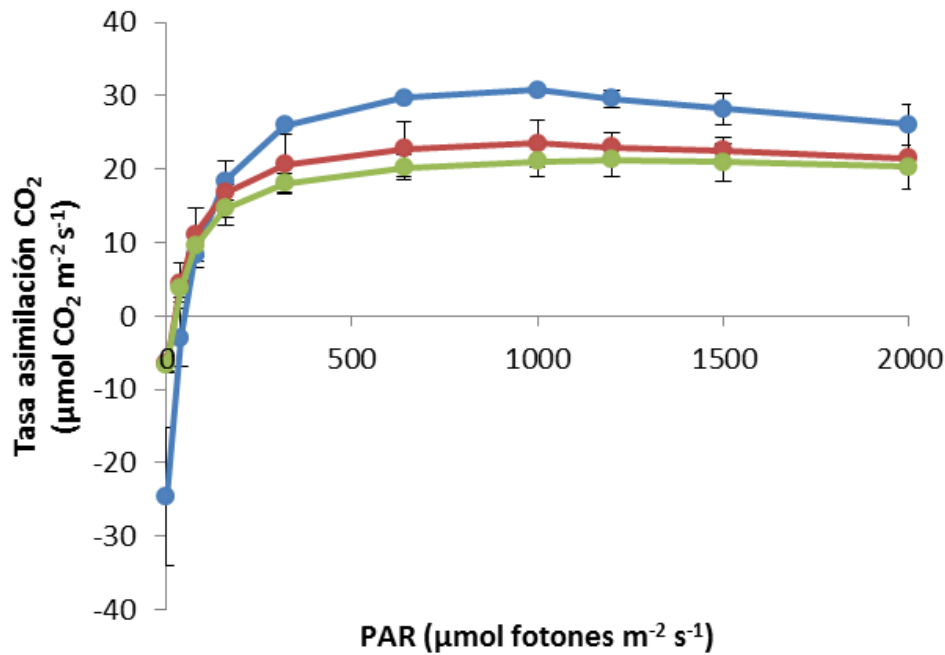


Figura IV.14. Curva de saturación luminosa para la asimilación de CO₂ en Col-0, *atprx52Salk* y *atprx72 Salk*. El análisis de la varianza entre las plantas se hizo utilizando el test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). Las barras de error representan la desviación típica de al menos 15 réplicas.

CO₂ subestomático o intercelular (C_i), conductancia estomática (g_s), tasa de transpiración (E) y eficiencia en el uso del agua (WUE), en los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis*

En la tabla IV.5 se muestra que, cuando se empleaban condiciones de intensidad luminosa y CO₂ constante (100 µmol fotones m⁻²s⁻¹ y 400 ppm respectivamente), los valores de equilibrio (en el minuto 15) para la concentración de CO₂ intercelular (C_i) no mostraban diferencias significativas al comparar los tres ecotipos. Cuando se empleaban concentraciones saturantes de CO₂ (1000 ppm) bajo las mismas condiciones de iluminación (tabla IV.5), los valores de C_i aumentaban aproximadamente 2,5 veces para todos los ecotipos, pero seguían sin observarse diferencias significativas entre ellos.

La conductancia estomática (g_s) y la tasa de transpiración (E) eran prácticamente iguales para los tres ecotipos en el estado de equilibrio a 400 ppm y bajo condiciones de CO₂ saturante (1000 ppm). Sin embargo, los valores de eficiencia en el uso del agua (WUE), tanto a 400 ppm como empleando concentraciones saturantes de CO₂ (1000

ppm), eran claramente más bajos para *atprx72Salk* debido a su menor tasa de asimilación de CO₂ (tabla IV.5).

	CO ₂ 400 ppm				CO ₂ 1000 ppm			
	Ci	gs	E	WUE	Ci	gs	E	WUE
Col-0	350,37±4,03 ^a	0,269±0,067 ^a	6,50±2,03 ^a	2,152±0.244 ^a	804,35±119,13 ^a	0,378±0,057 ^a	6,50±0,94 ^a	6,6±2,899 ^a
<i>atprx52Salk</i>	364±17,05 ^a	0,306±0,091 ^a	6,21±1,50 ^a	1,827±0.212 ^{ab}	910,9±91,93 ^a	0,438±0,054 ^a	6,30±1,09 ^a	6,576±1,279 ^a
<i>atprx72Salk</i>	365,44±13,50 ^a	0,241±0,071 ^a	5,50±0,89 ^a	1,617±0.242 ^b	814,76±162,63 ^a	0,384±0,067 ^a	6,04±1,16 ^a	4,48±1,413 ^b

Tabla IV.5. CO₂ intercelular (Ci), conductancia estomática (gs), tasa de transpiración (E) y eficiencia en el uso del agua (WUE) de los mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk* en comparación con Col-0 medidos a los 15 min a intensidad de luz de 100 μmol fotones m⁻² s⁻¹ y 400 ppm de CO₂ y en condiciones de CO₂ saturante (1000 ppm). Para ambas condiciones, el análisis de la varianza entre las tres poblaciones se hizo utilizando el test post-hoc de Tukey. Los resultados muestran la media ± la desviación típica de al menos 15 réplicas. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas por letras diferentes (p<0.05).

Cuantificación de pigmentos: Clorofilas y carotenoides

Se realizó una cuantificación de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) con el objetivo de detectar posibles variaciones como consecuencia del noqueo de los genes de *atprx52* y *atprx72* (figura IV.15)

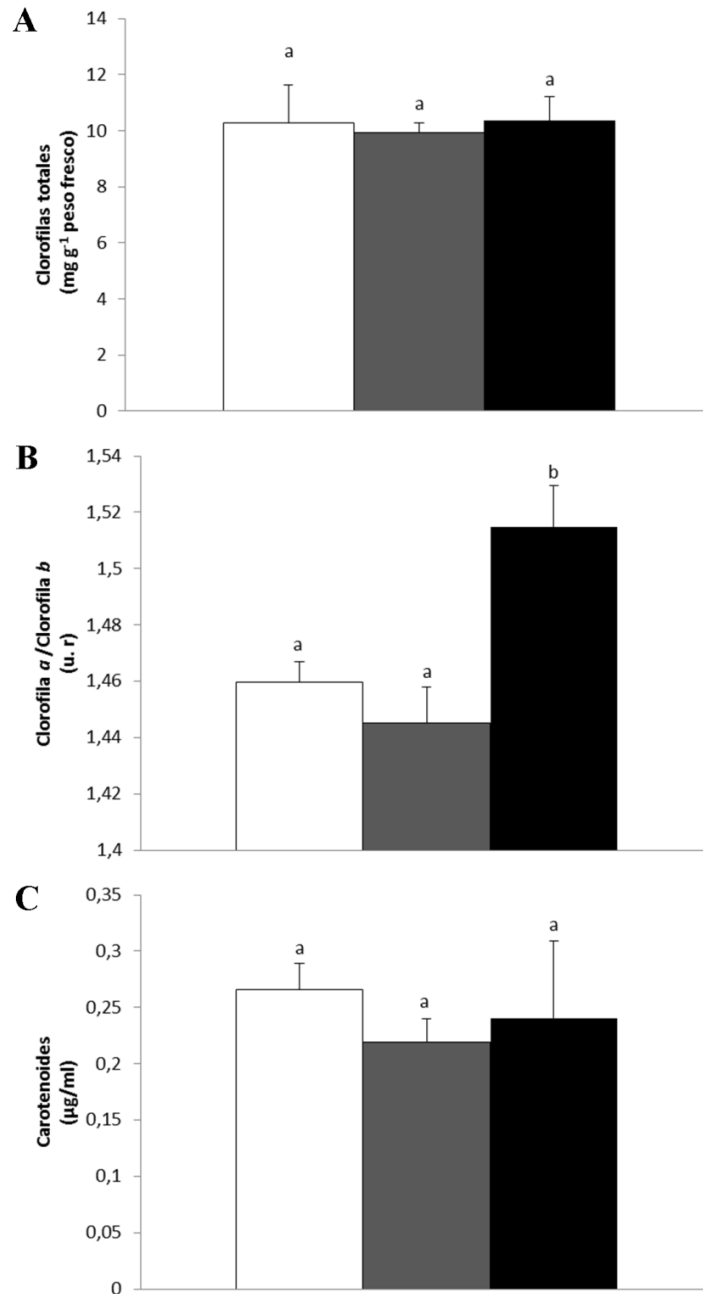


Figura IV.15. Cuantificación de clorofilas totales (A), proporción Clorofila *a* / Clorofila *b* (B) y contenido de carotenoides (xantofilas + carotenos) (C) en Col-0 (barras blancas), *atprx52Salk* (barras grises) y *atprx72Salk* (barras negras). El análisis de la varianza entre las plantas se hizo utilizando el test post-hoc de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas por letras diferentes (p<0,05). Las barras de error representan la desviación típica de al menos 8 réplicas.

Los resultados muestran que no existían diferencias en cuanto al contenido de clorofilas totales (figura IV.15A). Sin embargo se observaba un mayor ratio Chla/Chlb en *atprx72Salk* que en Col-0 y *atprx52Salk* (figura IV.15B). El contenido de carotenoides era similar en los tres ecotipos (figura IV.15C).

IV.2.5.2 Estudio de la capacidad fotosintética mediante la emisión de fluorescencia de la clorofila a. Test JIP.

Las medidas de fluorescencia de clorofila *a* dan información sobre la eficacia de los procesos fotoquímicos, separación de cargas y transporte electrónico que ocurren durante las primeras etapas de la fotosíntesis. Junto con los datos de intercambio gaseoso y asimilación de CO₂ obtenidos con el sistema IRGA, el empleo de las técnicas de medida de fluorescencia, nos deberían aportar una información bastante completa sobre posibles variaciones, alteraciones o adaptaciones en el proceso fotosintético entre los diferentes ecotipos de *Arabidopsis* estudiados en esta Tesis.

En primer lugar, se midió la variación de la eficacia fotosintética efectiva del fotosistema II (Φ_{PSII}) frente a un gradiente de intensidad luminosa (curvas de saturación de luz) empleando un fluorímetro PAM-2000 (Walz, Effendrich, Alemania) en Col-0 y en los mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk*. En la figura IV.15A observamos que los tres ecotipos presentaban un valor máximo de Φ_{PSII} a una intensidad luminosa de 34 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para después decaer, a intensidades luminosas más altas de forma exponencial. Los valores de Φ_{PSII} para Col-0 eran significativamente mayores a bajas intensidades luminosas (0-200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) que los de los mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk*.

A partir de los datos presentados en la figura IV.14 de la sección anterior, es fácil calcular el rendimiento cuántico o eficiencia fotosintética en la asimilación de CO₂ (figura IV.15B). Comparando esta figura con la figura IV.15A, podemos observar que los máximos de rendimiento cuántico de asimilación de CO₂ estaban, respecto a Φ_{PSII} , ligeramente desplazados hacia valores más altos de intensidad luminosa y que el valor más alto correspondía al mutante *atprx52Salk* en lugar de Col-0. Estas diferencias

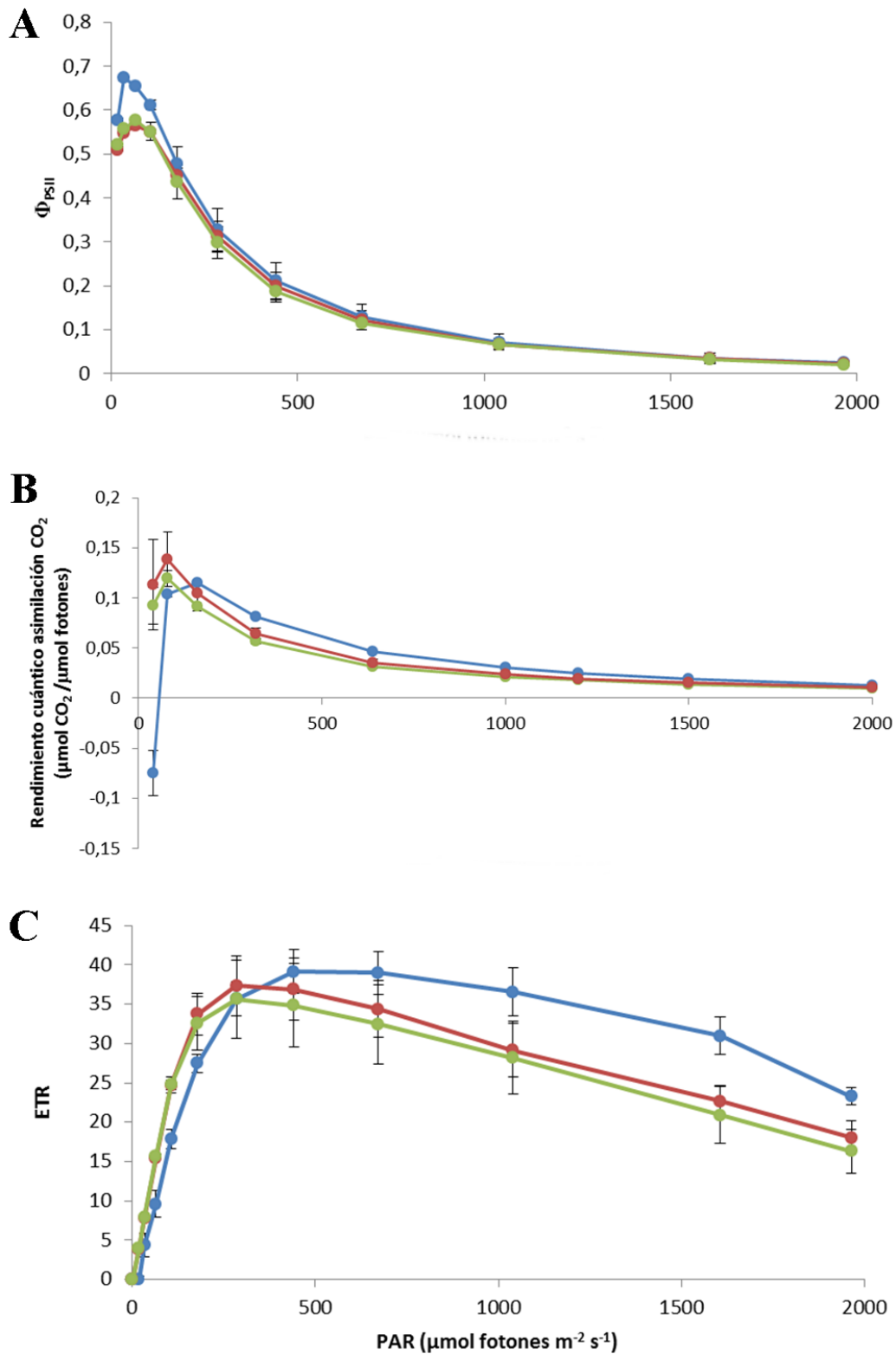


Figura IV.15. Eficiencia fotoquímica efectiva del fotosistema II (Φ_{psII}) (A), rendimiento cuántico o eficiencia fotosintética en la asimilación de CO_2 (B) y tasa de transporte electrónico fotosintético (ETR) (C) en Col-0 (líneas azules) y en los mutantes *atrpx52Salk* (líneas rojas) y *atrpx72Salk* (líneas verdes). El análisis de la varianza entre las plantas se hizo utilizando el test post-hoc de Tukey ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación típica de al menos 15 réplicas.

desaparecen si descontamos el valor de la tasa respiratoria en las estimaciones de IRGA de asimilación (A) de CO₂. Recordamos que el punto de compensación luminosa se sitúa en torno a 40 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para los mutantes y en torno a 60-80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para el ecotipo silvestre y que Col-0 presenta aparentemente una mayor tasa respiratoria en oscuridad que *atprx52Salk* y que *atprx72Salk*. Por lo demás, los datos de las figura IV.15A y IV.15B son coherentes entre sí, mostrando ambos que existía una caída exponencial del rendimiento cuántico fotosintético para las intensidades luminosas superiores a 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, pero que este rendimiento se mantenía ligeramente más alto en Col-0 que en los mutantes, a dichas intensidades luminosas.

En la figura IV.15C se presentan los resultados de la curva de saturación luminosa correspondiente a la tasa de transporte electrónico fotosintético (ETR). ETR es una estimación del número de electrones transportados desde el agua hasta los aceptores finales (ferredoxina y NADP⁺) por unidad de superficie y de tiempo. Los datos de esta última figura son comparables con los de la figura IV.14 de la sección precedente, mostrando que se producía una rápida subida tanto en la tasa de transporte electrónico como en la de asimilación de CO₂ cuando se incrementaba la intensidad de la iluminación hasta valores de unos 300 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Igualmente vemos que la ETR era mayor para Col-0 que para los ecotipos mutantes (figura 4.15C), como sucedía para la tasa de asimilación de CO₂ (figura IV.14). Sin embargo, también podemos observar que la ETR decaía a intensidades altas de luz (iguales o superiores a 500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) más rápidamente que la tasa de asimilación de CO₂, indicando que en los tres ecotipos estudiados se producía una inhibición de la respiración en condiciones de iluminación (efecto Kok: Kok, 1948, 1949; Sharp *et al.*, 1984).

Se ha utilizado el test JIP (Strasser 2000, 2004, ver materiales y métodos) para detectar posibles cambios en el funcionamiento de la maquinaria fotosintética en los mutantes deficientes en la peroxidasa 52 o la peroxidasa 72 de *Arabidopsis*. Para la realización del test JIP se empleó un fluorímetro PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK). Este fluorímetro es capaz de alcanzar un máximo de iluminación en unos pocos μs , de forma que es posible medir la emisión de fluorescencia completa a alta intensidad de luz (hasta 3000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) con alta resolución y con una muy buena relación señal/ruido (Strasser *et al.*, 1995) (ver materiales y métodos para mayor detalle).

Las mediciones se realizaron en hojas que recibían un pulso de luz roja saturante ($3000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$; $\lambda \text{ max, } 650 \text{ nm}$) tras haber permanecido 15 min en oscuridad.

En la figura IV.16 se muestran curvas de inducción de la fluorescencia correspondientes a cada uno de los mutantes y Col-0. En ellas se distinguen claramente las distintas fases del llamado “tránsito OJIP” (Munday y Govindjee 1969 a, b; Strasser *et al.*, 1995, 2000, 2004; Lazár, 1999; Papageorgiou *et al.*, 2007; Stirbet y Govindjee, 2011, 2012), siendo **O** el valor mínimo de la fluorescencia (F_0) medido a los 20 μs de comenzar la iluminación, momento en que todos los centros de reacción están oxidados (abiertos, en la terminología usada en el análisis de fluorescencia); **J**, es un punto de inflexión que aparece a los 2 ms ($F_J = F_{2\text{ms}}$) y está relacionado con la reducción de la quinona (Q_A); **I**, es un segundo punto de inflexión que aparece a los 20 ms ($F_I = F_{20\text{ms}}$) y está relacionada con la reducción parcial de Q_B , y por último **P**, es el valor máximo de la fluorescencia (F_m) que se alcanza tras aproximadamente 1s de iluminación y corresponde a la reducción total del pool de quinona (centros cerrados) (figura IV.16).

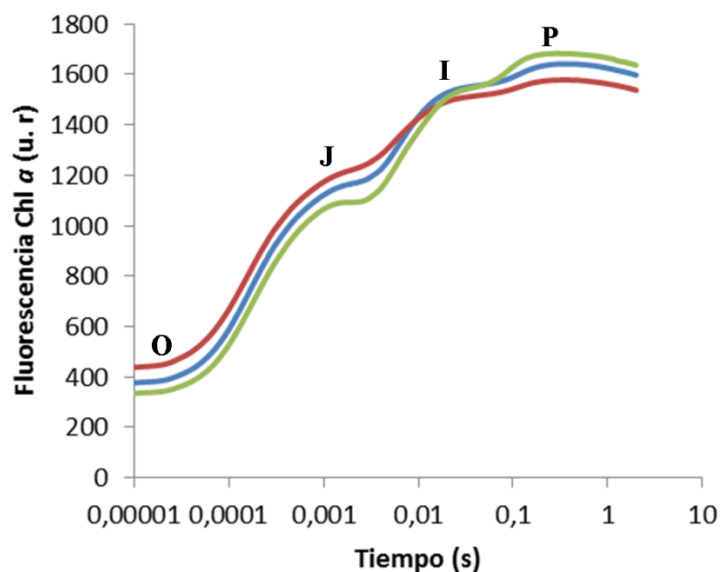


Figura IV.16. Curvas OJIP de fluorescencia de Col-0 (línea azul), *atprx52Salk* (línea roja) y *atprx72Salk* (línea verde). Tras 15 min de permanencia en oscuridad, se aplica un pulso de luz roja saturante ($3000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de 2 s de duración.

A partir del estudio de la cinética de las curvas de inducción de fluorescencia, se puede estimar la magnitud de los flujos de energía implicados en las primeras etapas de

la fotosíntesis, que constituye la base del test JIP (véase materiales y métodos). En la figura IV.17 se representa un esquema de flujo en el que se muestran las diferencias encontradas al comparar los tres ecotipos. El mutante *atprx52Salk* (figura IV.17, flechas en rojo; figura IV.18, barras azul oscuro; anexo 2) mostraba, respecto a Col-0, una disminución significativa de la eficiencia máxima de la fotoquímica primaria del PSII ($\phi_{P_0} = F_v/F_m$), asociada al aumento del valor de F_0 respecto al ecotipo silvestre, y un aumento de disipación de energía en la antena del PSII (reflejada en los parámetros DI_0/RC y DI_0/CS). El resto de los parámetros no variaba significativamente de los valores obtenidos en Col-0 ($p > 0,05$). En cambio, *atprx72Salk* (figura IV.17, flechas en verde; figura IV.18, barras azul claro; anexo 2) mostraba un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) del rendimiento del transporte electrónico (ϕ_{E_0}), de la cantidad de energía necesaria para cerrar todos los centros de reacción del PSII (S_m), del número de ciclos de reducción y oxidación de Q_A (N), y por último, un incremento también significativo estadísticamente, del transporte electrónico hacia los aceptores finales del PSI (representado por los parámetros ϕ_{R_0} , RE_0/RC y RE_0/CS).

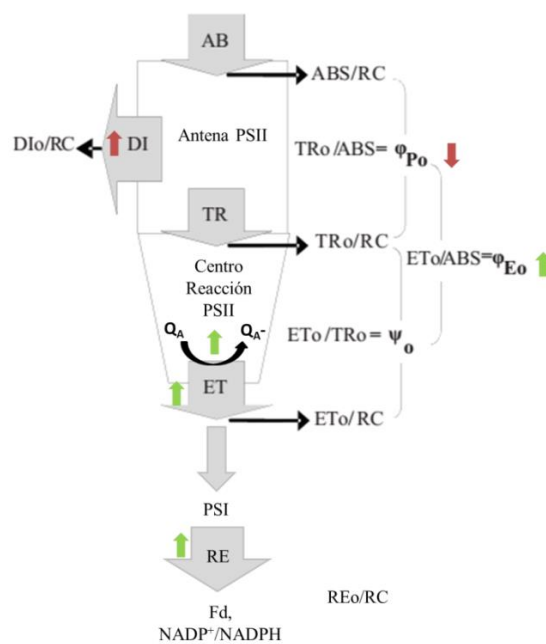


Figura IV.17. Respuestas de *atprx52Salk* (flechas rojas) y *atprx72Salk* (flechas verdes) a nivel de los flujos de energía en el aparato fotosintético. ABS se refiere al flujo de fotones absorbido por los pigmentos de la antena en el fotosistema II. Parte de esta energía de excitación (DI) se disipa como calor y en menor grado como emisión de fluorescencia y la otra parte es canalizada como flujo capturado TR al centro de reacción y es convertido a energía redox reduciendo al aceptor de electrones Q_A a Q_A^- el cual se oxida creando transporte de electrones ET. A partir de estas fluctuaciones de flujo energético se determinan los parámetros de eficiencia cuántica (ϕ_{P_0} , ψ_0 , ϕ_{E_0}). Adaptado de Ceacero *et al.* (2012).

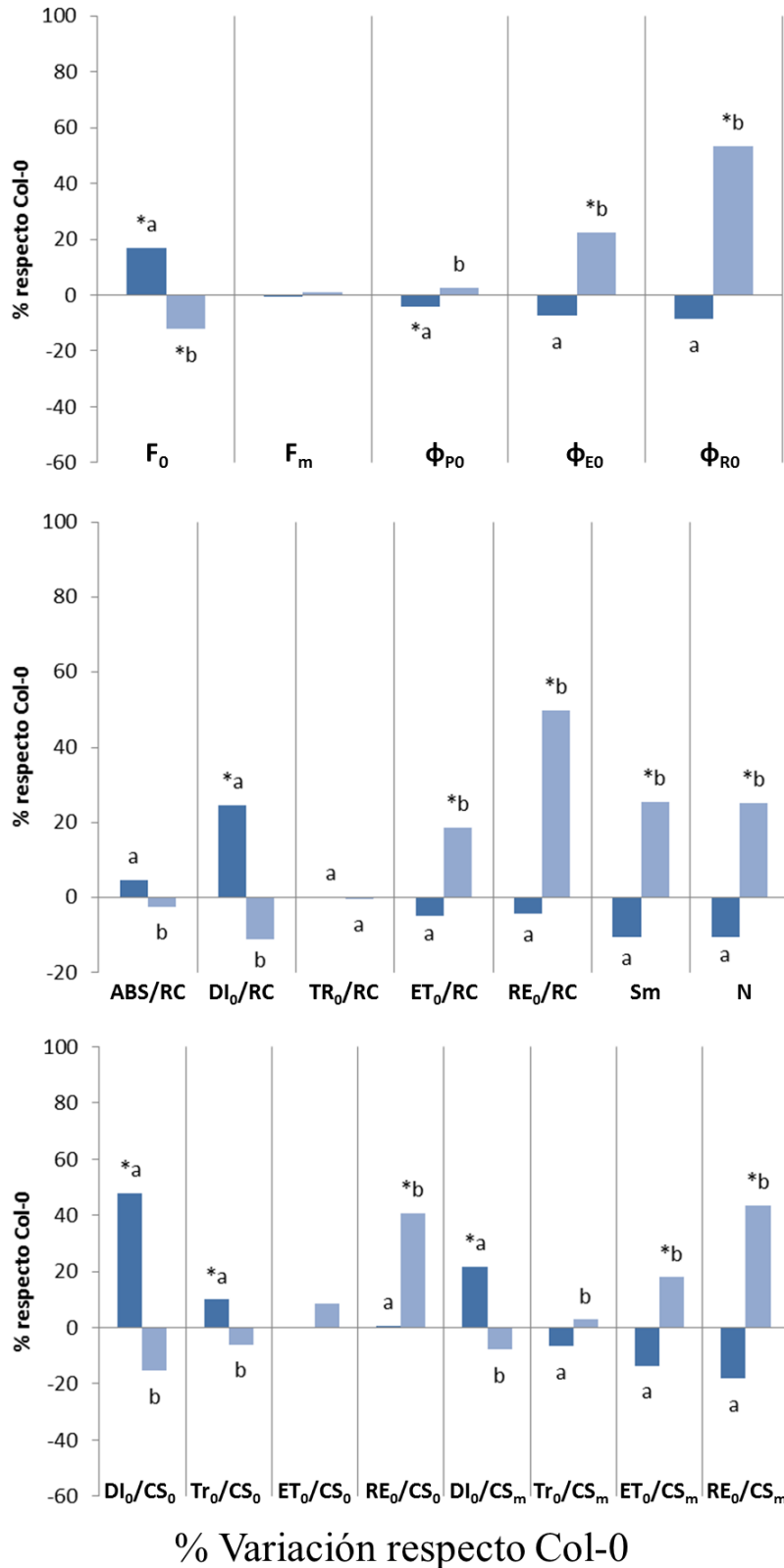


Figura IV.18. Cambios en los principales parámetros del test JIP en los mutantes *atrpx52Salk* (barras azul oscuro) y *atrpx72Salk* (barras azul claro) expresados como porcentaje respecto al ecotipo silvestre (Col-0). Las diferencias significativas respecto a Col-0 están marcadas por un asterisco y las diferencias significativas entre los mutantes están marcadas por diferente letra ($p < 0,05$) ($n > 20$).

IV.2.5.3 Estudio de los efectos producidos por tratamiento con MV en los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis*

Con el objeto de testar la resistencia de los mutantes frente a una situación de estrés, se comparó la resistencia de las plantas a condiciones de estrés fotooxidativo, empleando intensidades crecientes de iluminación (50, 200 y 2000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y tratamientos con 20 μM metil viológeno (MV) aplicado sobre las hojas mediante pulverización (ver materiales y métodos).

Efectos del estrés oxidativo sobre la asimilación de CO_2 en los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis*

Para las medidas de asimilación de CO_2 se emplearon plantas previamente adaptadas 15 minutos en oscuridad y a humedad relativa (HR) ambiental ($15\% \pm 2$) (ver materiales y métodos).

Cuando las plantas eran sometidas a condiciones de estrés fotooxidativo mediante aplicación de 20 μM MV, disminuía drásticamente la tasa de asimilación de CO_2 en todos los casos estudiados respecto a los controles (figura IV.19A, B). Asimismo, los resultados muestran que a bajas intensidades de luz (50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) dicha disminución era similar en los tres tipos de plantas (figura IV.19C), pero a media y alta intensidad (200 y 2000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) el mutante *atprx72Salk* mostraba una mayor resistencia frente al herbicida (figura IV.19C).

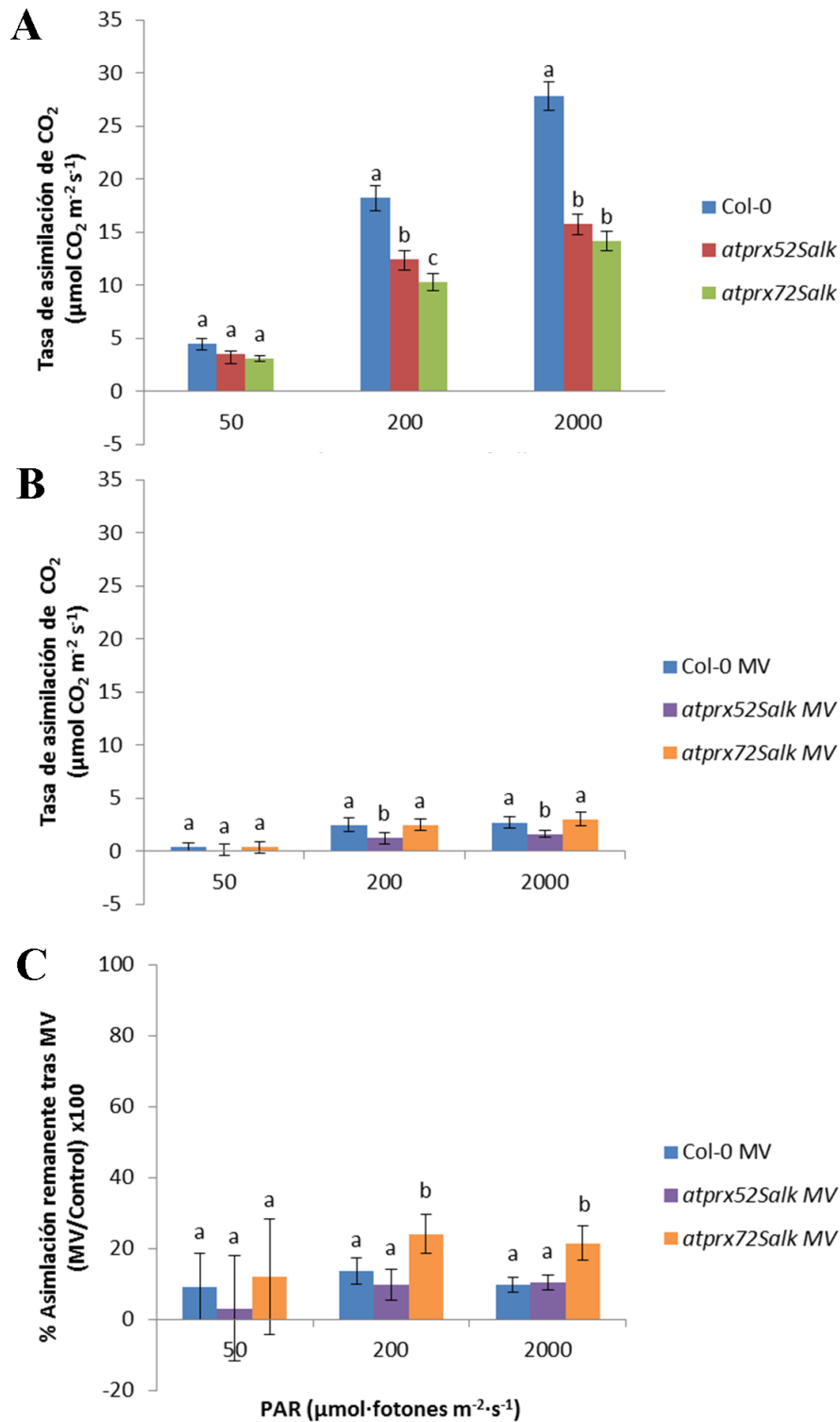


Figura IV.19. Tasa de asimilación de CO₂ del ecotipo silvestre (Col-0) en comparación con los mutantes de peroxidasa 52 y 72 en condiciones control (A) y bajo condiciones de estrés fotooxidativo por aplicación de 20 µM MV (B). C: porcentaje de actividad remanente tras el tratamiento con 20 µM MV respecto al respectivo control sin tratamiento. Las diferencias estadísticamente significativas están marcadas por letras diferentes (p<0,05). Las barras de error representan la desviación típica de al menos de 15 réplicas.

Variaciones en la concentración de CO₂ subestomático o intercelular (Ci) en los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis* tras tratamientos fotooxidativos

En la figura IV.20 se muestra que, cuando las plantas eran expuestas a intensidades luminosas creciente en condiciones de estrés fotooxidativo por aplicación de MV, se observaba una disminución de Ci, respecto a los controles no tratados con MV. El tratamiento con MV, al reducir la tasa de fotosíntesis, hace que se mantenga más alta la concentración de Ci ya que disminuye el consumo celular de CO₂. No se encontraron, sin embargo, diferencias significativas entre el comportamiento de Col-0 y los mutantes.

Estos resultados, junto con los presentados (Ci, gs y E) en la sección anterior para plantas no tratadas con MV (tabla IV.5), indican que no existen diferencias en la tasa de intercambio gaseoso entre los mutantes y Col-0 (tabla IV.5) y que, por tanto, las diferencias en la tasa de fotosíntesis son debidas directamente a diferencias en la eficacia de asimilación del carbono.

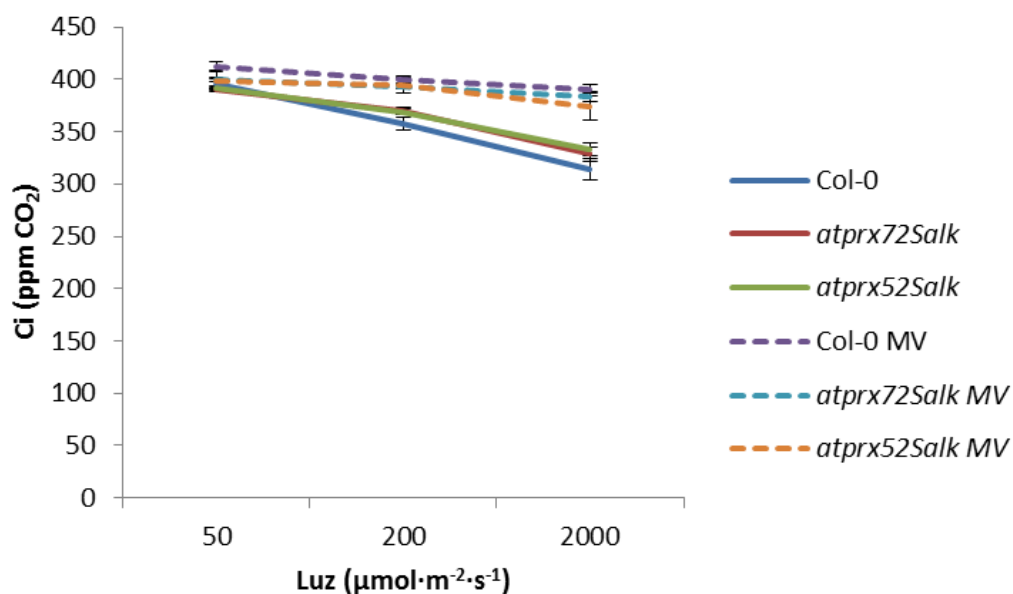


Figura IV.20. CO₂ intercelular (Ci) en los mutantes de peroxidasa y el ecotipo silvestre medidos a diferentes intensidades de iluminación (50, 200 y 2000 µmol fotones m⁻² s⁻¹), en condiciones normales de crecimiento y bajo estrés fotooxidativo por metilviológeno 20 µM (MV). Las barras de error representan la desviación típica de al menos de 15 réplicas.

Efectos del estrés fotooxidativo sobre la etapa fotoquímica de la fotosíntesis en los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis*

Las mediciones se realizaron en plantas que recibían un pulso de luz saturante de luz roja ($3000 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) tras haber permanecido 15 minutos en oscuridad.

Los cambios que se producían en Col-0 tras el tratamiento con MV, aunque significativos, eran menores que en los mutantes (figura IV.21A, B, C). En el caso de *atprx52Salk*, se observó la mayor disminución del rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria ($\phi_{\text{Po}} = F_v/F_m$) (figura IV.21D), y el incremento más notable de la disipación de energía (DI_0/RC , DI_0/CS) (figura IV.21E, F). En Col-0 y *atprx72Salk* se producía, tras el tratamiento con MV, un aparente aumento en la eficiencia del transporte electrónico en PSII (ϕ_{Eo}) y, en todos los ecotipos, un aumento aparente del transporte hacia los aceptores finales de PSI (ϕ_{Ro}), especialmente en *atprx72Salk* (figura IV.21G). En este mutante también se observaba, tras tratamiento con MV, un aumento del número de ciclos de reducción (N) necesarios para cerrar todos los centros de reacción (figura IV.21H). Estos últimos efectos son probablemente debidos a la acción del MV como aceptor artificial de electrones en PSI e indicarían una limitación en la capacidad del lado aceptor del PSI en condiciones control (Ekkehard y Stitt, 1989; Moustaka y Moustakas, 2014), que se interpreta como presencia de concentraciones subóptimas de aceptores finales (ferredoxina, NADP^+) oxidados en las plantas no tratadas con MV y especialmente en *atprx72Salk* (figura IV.22, barras rojo claro).

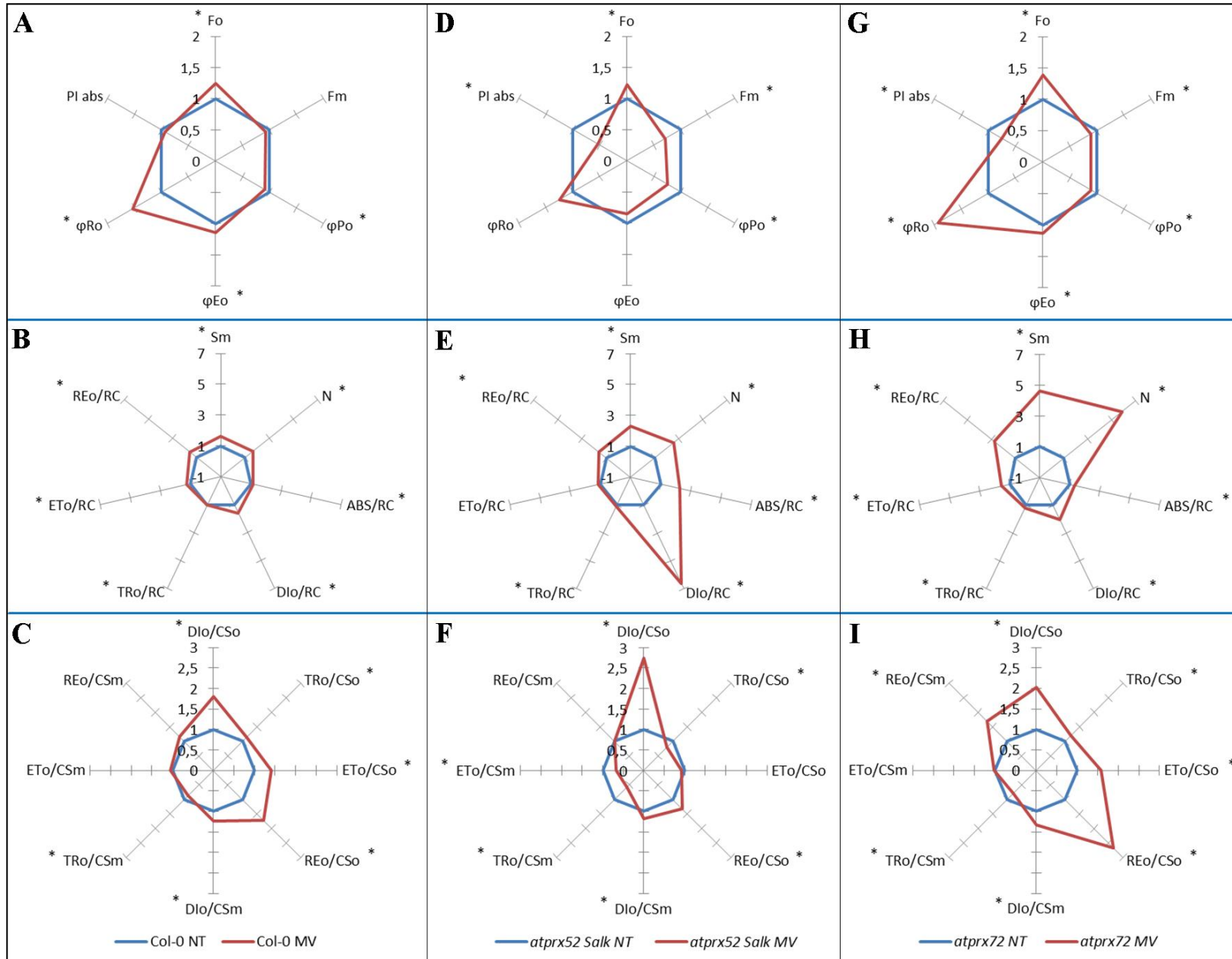


Figura IV.21. Comparación de los cambios en los principales parámetros del test JIP en el ecotipo silvestre (Col-0) (A, B y C) y en los mutantes *atprx52Salk* (D, E y F) y *atprx72Salk* (G, H e I), bajo condiciones control (NT, no tratamiento) (líneas en azul) y bajo estrés causado por 20 μ M MV (líneas en rojo). Las diferencias significativas están marcadas por un asterisco ($p < 0,05$) ($n > 20$).

Para poder resaltar las diferencias entre los ecotipos en los efectos del tratamiento con MV, se compararon las respuestas de *atprx52Salk* y *atprx72Salk* con respecto a Col-0 (figura IV.22; anexo 3). Los resultados eran, en líneas generales, similares a los que se presentaron en la sección anterior para plantas no tratadas con MV (figura IV.18; anexo 2), pero las diferencias entre los ecotipos se apreciaban de forma más acusada.

Era significativa la gran diferencia que se encontraba, en la magnitud de los procesos de disipación (DI_0/RC y DI_0/CS) y de absorción (ABS/RC) entre *atprx52Salk* y Col-0 tratados con MV (figura IV.22, barras rojo oscuro) y entre *atprx72Salk* y Col-0 para los parámetros RE_0/RC , Sm y N , como hemos visto anteriormente.

El acusado aumento del parámetro ABS/RC en *atprx52Salk* tras tratamiento con MV, no representaba un aumento del tamaño de la antena sino una disminución de la densidad de centros de reacción activos (RC/CS_0 , tabla IV.6). Por otra parte, el mayor aumento de la disipación de energía en presencia de MV (DI_0/RC ; DI_0/CS_0) en este mutante, podía estar relacionado con la aparición de un mayor número de centros de reacción “silenciosos” (RC_{si} , tabla IV.6).

Este tipo de centros de reacción, que aparecen como respuesta frente a situaciones de estrés, no reducen Q_A ni devuelven a la antena la energía de excitación capturada. Por tanto disipan toda la energía en forma de calor y no contribuyen a la fluorescencia variable (Strasser y Tsimilli-Michael, 1998; Tsimilli-Michael *et al.*, 1998; Strasser *et al.*, 2000). El método empleado para calcular la fracción (RC_{si}/RC_{act}) de centros de reacción activos (RC_{act}) que se transforman en centros de reacción silenciosos (RC_{si}) está descrito en Materiales y Métodos.

	RC/CS_0 Control	RC/CS_0 MV	RC_{si}/RC_{act}
Col-0	106,07±0,038 ^a	116,26±0,19 ^c	0,11±0,09 ^a
<i>atprx52Salk</i>	118,60±0,025 ^b	64,01±0,19 ^d	0,56±0,05 ^b
<i>atprx72Salk</i>	111,73±0,031 ^a	106,8±0,21 ^c	0,25±0,09 ^a

Tabla IV.6. Densidad de centros de reacción activos (RC/CS_0) en plantas control y tratadas con MV, y fracción de centros de reacción silenciosos (RC_{si}/RC_{act}). Las diferencias significativas están marcadas por diferente letra ($p<0,05$) ($n>15$).

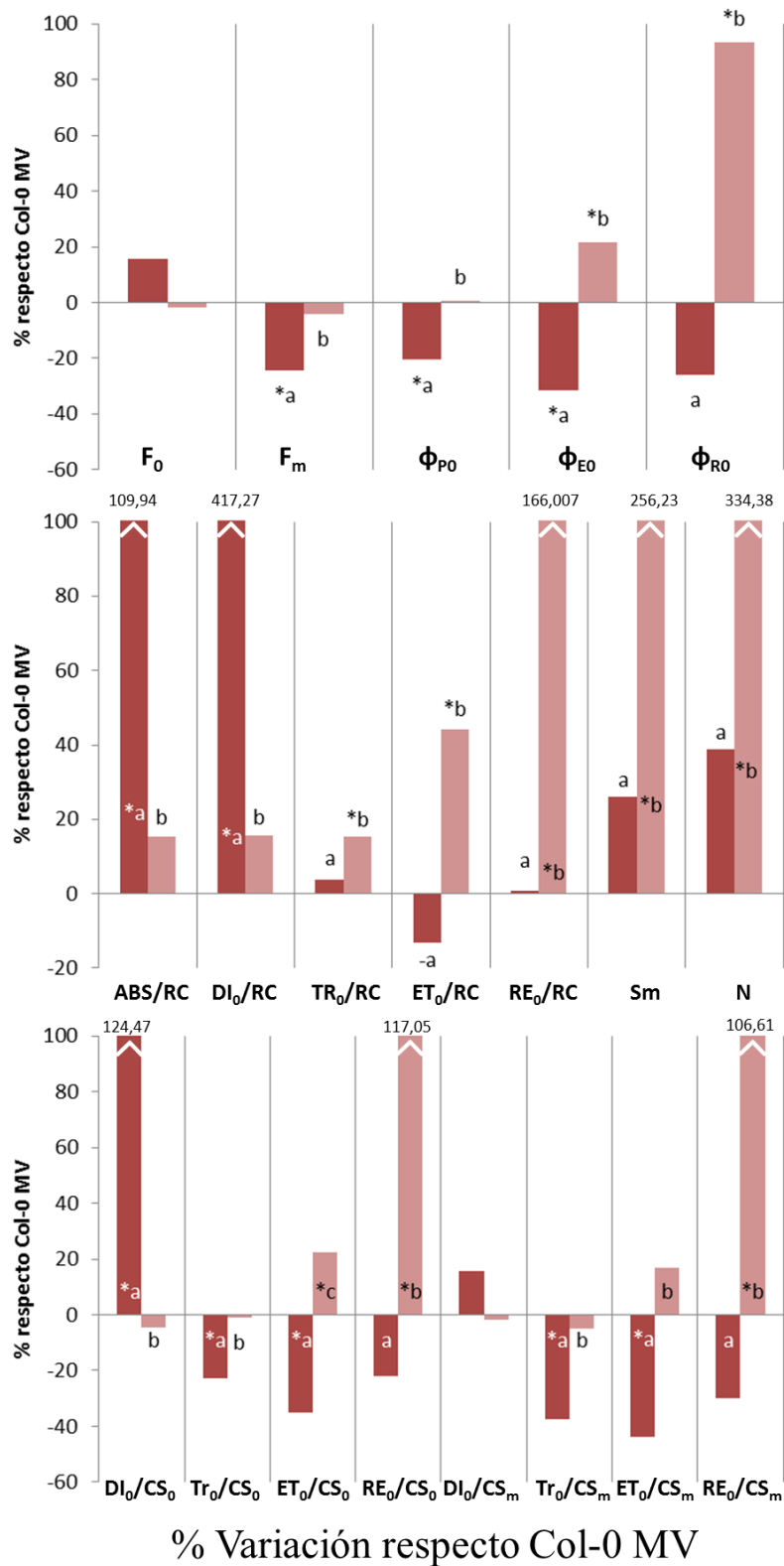


Figura IV.22. Cambios en los principales parámetros del test JIP por estrés con MV en los mutantes *atrpx52Salk* (barras rojo oscuro) y *atrpx72Salk* (barras rojo claro) expresados como porcentaje respecto al ecotipo silvestre (Col-0). Las diferencias significativas respecto a Col-0 están marcadas por un asterisco y las diferencias significativas entre los mutantes están marcadas por diferente letra ($p < 0,05$) ($n > 20$).

IV.3 Discusión

Los cambios que se producen en el contenido en lignina y en su composición monomérica cuando se altera la biosíntesis de monolignoles, está muy bien documentada en la bibliografía científica (Dwivedi *et al.*, 1994; Kajita *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Sewalt *et al.*, 1997; Piquemal *et al.*, 1998; Franke *et al.*, 2000; Chabannes y Barakate, 2001; Huntley *et al.*, 2003; Abdulrazzak *et al.*, 2006; Coleman *et al.*, 2008). Sin embargo, hay muy poca información sobre los efectos que la alteración en la cantidad y estructura de la lignina tienen sobre la fisiología de las plantas y sus efectos sobre el desarrollo (Coleman *et al.*, 2008).

Los mutantes *atprx52* y *atprx72* de *Arabidopsis thaliana* presentan una disminución de hasta un 40% en el contenido de lignina (Fernández-Pérez *et al.*, 2013; Herrero *et al.*, 2013b). Además, ambos mutantes presentan diferencias en la expresión genética, fenotípicas, en el metabolismo fenilpropanoide y en fotosíntesis. También, se ha visto que la supresión de la peroxidasa 52 produce diferentes efectos que la supresión de la peroxidasa 72.

En cuanto a las diferencias en los niveles de expresión genética, se ha determinado que los mutantes defectivos en peroxidasa 52 poseen elevados niveles de expresión de peroxidasa 72 (tabla IV.3), en lo que parece ser una respuesta de la planta para compensar el déficit o ausencia de peroxidasa 52; pero que, sin embargo, los mutantes defectivos en la peroxidasa 72 no aumentan los niveles de expresión de la peroxidasa 52. Diferencias similares en la expresión de dos isoenzimas se han visto también en mutantes de PAL deficientes en lignina (Rohde *et al.*, 2004). En el caso de las peroxidases, dada la elevada homología entre distintas isoformas, es factible que exista redundancia de función y que la falta de una peroxidasa pueda ser suplida por otra (Valerio *et al.*, 2004). Este hecho refleja la necesidad evolutiva de mantener la función esencial que estas enzimas desempeñan en la fisiología de la planta. Por otra parte, la aparente redundancia de isoenzimas de peroxidasa podría ser la causa de la heterogeneidad mostrada por las ligninas dentro de las diferentes áreas de la pared celular (Ros Barceló, 1997).

Como ya han demostrado numerosos estudios, la supresión de la actividad de una o varias enzimas implicadas en lignificación tiene consecuencias en el metabolismo de las plantas, como cambios en el metabolismo fenilpropanoide (Chapple *et al.*, 1992; Franke *et al.*, 2002; Abdulrazzak *et al.*, 2006; Besseau *et al.*, 2007; Derikvand *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010), cambios en los procesos fotosintéticos (Coleman *et al.*, 2008),

cambios en el metabolismo de los carbohidratos y aminoácidos (Coleman *et al.*, 2008; Dauwe *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2004) o cambios en el transporte de hormonas (en especial, auxinas) (Besseau *et al.*, 2007; Gallego-Giraldo *et al.*, 2011).

También es abundante la bibliografía que muestra que la supresión de una de las enzimas de la ruta que conduce a la síntesis de ligninas puede producir cambios en la expresión y regulación de las dos rutas restantes del metabolismo fenilpropanoide (flavonoides y ésteres de sinapato). Estos cambios son muy variados: acumulación (Chapple *et al.*, 1992; Franke *et al.*, 2002; Besseau *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010) o disminución (Rohde *et al.*, 2004; Dauwe *et al.*, 2007) de flavonoides, y/o acumulación (Derikvand *et al.*, 2008) o disminución (Chappel *et al.*, 1992; Abdulrazzak *et al.*, 2006) de ésteres de sinapato. Además, se sabe que la acumulación diferencial de intermediarios de una ruta pueden afectar a la transcripción de otros genes (Boerjan *et al.*, 2003).

Asimismo, se ha demostrado que en determinadas situaciones, las enzimas de la ruta del sikimato, productora de fenilalanina, actúan de forma coordinada con las enzimas post-fenilalanina del metabolismo de los flavonoides y fenilpropanoides pudiendo desplazar el flujo de carbono a cualquiera de estas ramas en función de las necesidades (Weaver y Herrmann, 1997).

En base a estos datos, eran de esperar cambios en el contenido de fenoles solubles totales en los mutantes de peroxidasa que describimos en esta Tesis. Así ocurre, efectivamente, en el mutante *atprx72Salk*, donde se pone de manifiesto una mayor producción de fenoles solubles (figura IV.11). Pero no ocurre lo mismo en el mutante *atprx52Salk*. Este resultado, junto con la mayor expresión de AtPrx72 en *atprx52Salk*, indica que los efectos sobre la regulación del metabolismo fenilpropanoide producidos por cada una de las dos mutaciones, son diferentes.

Los cambios en el metabolismo fenilpropanoide pueden, a su vez, tener efectos sobre el desarrollo. Por ejemplo, Lee *et al.* (2013) describieron la implicación de la peroxidasa 72 en la lignificación de la banda de Caspary y cómo cambios en la bioquímica de la banda de Caspary podrían comprometer la captación selectiva de iones en las raíces y conducir a la generación de plantas deficientes en su desarrollo. También los cambios en el metabolismo fenilpropanoide pueden afectar a la viabilidad de las semillas, tal y como demostraron Rohde *et al.*, (2004) en mutantes de PAL en

Arabidopsis. Aunque las mutaciones *atprx52Salk* y *atprx72Salk* no parecen afectar a la producción de semillas (figuras IV.9C y IV.10C), éstas tienen su viabilidad comprometida pudiendo indicar un papel de las peroxidasas 52 y 72 en la determinación de la eficacia biológica de la planta.

No obstante, hacen falta nuevas aproximaciones para corroborar estos resultados ya que no se pueden descartar los efectos que la inserción de un fragmento de T-DNA puede producir en el genoma de la planta, como deleciones y translocaciones que pueden llegar a afectar a la expresión o regulación de otras actividades metabólicas (Wang, 2008).

También se observaron efectos de las mutaciones sobre los niveles de proteínas. La supresión de AtPrx52 o de AtPrx72 indujo una reducción del contenido proteico en cada una de las respectivas líneas mutantes (tabla IV.4). A pesar de ello, *atprx52Salk* posee una actividad peroxidasa superior a Col-0 y *atprx72Salk* (tabla IV.4), a la que posiblemente contribuyen los altos niveles de expresión de peroxidasa 72 (tabla IV.3) en esta línea mutante.

En cuanto a las características fenotípicas, el principal efecto fenotípico común que tienen los mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk* es una ralentización en el crecimiento durante las primeras fases del desarrollo, lo que conlleva menor producción de ramas laterales, menor área foliar, menor radio de la roseta y, principalmente, menor altura de los tallos (figuras IV.8-IV.10). Estas diferencias fenotípicas tienden a desaparecer a lo largo del tiempo, llegando, hacia el final del ciclo de vida de las plantas, a niveles de desarrollo similares a Col-0 (figuras IV.9 y IV.10). Es algo común que en las plantas sometidas algún tipo de alteración o estrés inducido, se produzca una reducción en el crecimiento, que puede ser causada por la reubicación de los recursos metabólicos entre las diferentes rutas fisiológicas con el fin de maximizar la supervivencia de la planta (Park *et al.*, 2007). La respuesta de los mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk*, puede ser considerada por tanto, como un reflejo del mecanismo homeostático que re-programa el patrón de crecimiento original para compensar la mutación que llevan en su genoma y el déficit en lignina que esta les provoca (figuras IV.9 y IV.10). A pesar de que se han descrito fenómenos de estrés hídrico en plantas deficientes en el contenido de lignina, asociado a problemas en el transporte del agua a través de un xilema poco lignificado o defectuoso (Sperry, 2000; Tuzet *et al.*, 2003; Coleman *et al.*, 2008; Voelker *et al.*, 2011), los mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk* no

presentaron ningún síntoma apreciable de estrés hídrico como epinastia, marchitez, clorosis o envejecimiento acelerado (figura IV.8).

Previamente se han descrito varios mutantes de enzimas implicadas en la biosíntesis de lignina o de la ruta general de los fenilpropanoides que causan enanismo u otros defectos en el desarrollo que no se pueden atribuir solamente a defectos en el desarrollo xilemático (Franke *et al.*, 2002; Abdulrazzak *et al.*, 2006; Coleman *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2014). Como reportaron Herrero *et al.*, (2013b), las diferencias en el crecimiento y desarrollo entre Col-0 y los mutantes pueden ser debidas a cambios en el balance de hormonas en relación a variaciones en la expresión de ciertas peroxidasas de clase III. Como se ha mencionado en el capítulo III.2.5 de esta Tesis sobre regulación hormonal, los genes de peroxidasa responden a un abanico de hormonas entre las cuales, las auxinas juegan un papel muy importante (Gutiérrez *et al.*, 2009; López Núñez-Flores *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2014). Es sabido que las peroxidasas son capaces de degradar auxinas *in vitro*, y por tanto, un cambio en el balance de hormonas, especialmente auxinas, influiría en la tasa de formación de tejidos (Passardi *et al.* 2007). La relación entre el metabolismo fenilpropanoide y el transporte de auxinas han sido reportadas en la bibliografía (Brown *et al.*, 2001; Mathesius *et al.*, 1998). De hecho, en *Arabidopsis*, el silenciamiento del gen HCT de la ruta de biosíntesis de ligninas produjo una fuerte reducción del crecimiento de las plantas que estaba correlacionado con una reducción del transporte de auxinas (Besseau *et al.*, 2007). Asimismo, aumentos en la concentración de ácido salicílico en mutantes defectivos en lignificación se han asociado a la aparición de síntomas de enanismo (Gallego-Giraldo *et al.*, 2011) o también la acumulación de glicósidos del alcohol dehidrodiconiferilo han tenido efecto promotor de la división celular y por tanto, puede contribuir a los defectos en el crecimiento de las plantas en las cuales el metabolismo fenilpropanoide está alterado (Binns *et al.*, 1987; Lynn *et al.*, 1987; Teutonico *et al.*, 1991; Orr y Lynn, 1992).

En cuanto a los efectos sobre intercambio gaseoso, respiración y fotosíntesis, los datos obtenidos con el equipo IRGA indican que tanto *atprx52Salk* como *atprx72Salk* presentan una disminución de la tasa de asimilación de CO₂ respecto a Col-0 (figura IV.13). Dada la naturaleza de estos mutantes, parecería inmediato intentar relacionar una posible disminución de la capacidad fotosintética con alteraciones en la vascularización de las plantas que condujesen a disminuciones del contenido hídrico en las hojas. Sin embargo, tres conjuntos de datos hacen descartar esta hipótesis. En primer

lugar y cómo se ha mencionado anteriormente, las plantas mutantes no presentan síntomas de estrés hídrico. En segundo lugar, estudios histológicos llevados a cabo en el mutante *atprx72Salk* (Herrero *et al.*, 2013b) muestran que la vascularización se mantiene aunque se observe un adelgazamiento de las paredes secundarias en los haces vasculares. Por último, los datos referentes a apertura estomática y transpiración (tabla IV.5) muestran que no hay diferencias significativas en el valor de estos parámetros entre Col-0 y los mutantes, lo cual indica que no hay alteraciones en el equilibrio hídrico debidas al déficit en las peroxidasas 52 ó 72.

Siguiendo con el análisis de los resultados presentados en la figura IV.13, resulta también interesante la disminución de la tasa de respiración en oscuridad que se observa en los mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk* respecto al ecotipo silvestre Col-0. Esto hace que el punto de compensación luminosa esté ligeramente desplazado hacia valores más altos de intensidad luminosa en Col-0 que en los mutantes (figura IV.13, figura IV.15 B). De todas formas, a la intensidad de luz de crecimiento ($\sim 100 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e intensidades luminosas más altas, la tasa de fotosíntesis neta es más alta en Col-0 que en los mutantes. Si tenemos, además, en cuenta que los mutantes presentan una menor acumulación de proteínas y de azúcares solubles (tabla IV.4, figura IV.12), es bastante plausible pensar que las mutaciones *atprx52Salk* y *atprx72Salk* producen una disminución de la tasa metabólica (Gillooly *et al.*, 2001). Como ya se ha mencionado, la tasa de crecimiento se ajusta al estado metabólico de la planta y, por tanto, una disminución de la tasa metabólica puede llegar a explicar, que el crecimiento de *atprx52Salk* y *atprx72Salk* sea más lento que el de Col-0 (figuras IV.8-IV.10). Bajo condiciones normales, el 20% de todo el carbono fijado es bombeado hacia la ruta del sikimato (Hermann, 1995) y uno de los principales sumideros de esta ruta es la biosíntesis de ligninas. La disminución del tamaño de este sumidero debe conllevar ajustes en todo el metabolismo del carbono, como puede deducirse de las interacciones que se presentan de forma esquemática en la figura IV.23. Por otra parte, Meyer *et al.* (2007) consideran que determinados metabolitos pueden ejercer su control sobre el crecimiento no solo por su papel como sustratos para la síntesis de compuestos celulares, sino actuando como señales que producen cambios en el crecimiento. En este sentido, recordemos que en *atprx72Salk* la disminución de ligninas va acompañada por un aumento del contenido de compuestos fenólicos solubles de unas tres veces respecto a Col-0 (figura IV.11) y como hemos mencionado anteriormente, muchos de estos

compuestos fenólicos tienen capacidad de actuar como señales de desarrollo o influir en la actividad de algunas hormonas vegetales.

Pese a las similitudes generales que presentan los fenotipos de *atprx52Salk* y *atprx72Salk* (retardo en el crecimiento, disminución de la tasa fotosintética, etc), también presentan diferencias significativas entre ellos. En primer lugar, no olvidemos dos diferencias importantes entre el comportamiento de *atprx52Salk* y *atprx72Salk*, que pueden condicionar todas las demás: **1.** La supresión de *atprx52* produce una sobreexpresión de *Atprx72* (tabla IV.3) y de la actividad peroxidasa total (tabla IV.4), mientras que no se observa sobreexpresión de *Atprx52* con la supresión de *atprx72*, que además conlleva una disminución de la actividad peroxidasa total; **2.** Probablemente como consecuencia de lo anterior en *atprx72Salk* se observa una alta acumulación de fenoles solubles que no se detecta en *atprx52Salk* (figura IV.11). De aquí, cabría esperar que los efectos producidos por las mutaciones, sean más drásticos en el mutante *atprx72Salk* que en *atprx52Salk*. Esto se cumple para la reducción de la tasa fotosintética, que es mucho más acusada en el mutante *atprx72Salk* mientras que en *atprx52Salk* se iguala a la de Col-0 cuando se emplea baja iluminación ($<100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) o cantidades saturantes de CO_2 (1000 ppm, figura IV.13C). Estos resultados sugieren que en *atprx52Salk*, una parte importante de la disminución de la tasa de asimilación de CO_2 puede ser debida a fotorrespiración. Puesto que en *atprx72Salk* no se observan los efectos mencionados de iluminación o de concentraciones saturantes de CO_2 , se puede descartar que la disminución de la tasa de asimilación sea debida a un aumento de la fotorrespiración respecto a Col-0. Es, no obstante, muy complicado establecer una relación causal entre la supresión de una isoenzima de peroxidasa y un incremento de la fotorrespiración, cuyos niveles están principalmente determinados por el balance CO_2/O_2 en el entorno de Rubisco y por la temperatura (Foyer *et al.*, 2009). Sin embargo, estudiando plantas de tabaco deficientes en lignificación, Dauwe *et al.* (2007) mostraron que un aumento de los fenómenos de disipación de energía luminosa, junto con una bajada de la eficiencia del PSII, estaban relacionados con un aumento de la fotorrespiración. Nuestros resultados muestran que *atprx52Salk* sufre una disminución significativa de la eficiencia de la fotoquímica primaria del PSII ($\phi_{\text{Po}} = F_v/F_m$) y un aumento de la disipación de energía en PSII (DI_0/RC y DI_0/CS) (figuras IV.17 y IV.18), que son concordantes con los de Dauwe *et al.* (2007) y apoyan el posible aumento de la actividad fotorrespiratoria en este mutante.

Por otra parte, se observa que *atprx52Salk* presenta una caída muy rápida del rendimiento cuántico de asimilación de CO₂ (figura IV.15B), a intensidades de 100 μmol fotones m⁻² s⁻¹ o superiores, lo cual concordaría con una estimulación de fotorrespiración. Se ha propuesto que la fotorrespiración puede disminuir el exceso de ATP y poder reductor que se acumularía bajo condiciones de estrés que condujesen a una disminución de la disponibilidad de CO₂, protegiendo a las plantas de fenómenos de fotooxidación (Kozaki y Takeba, 1996). También el incremento de la disipación de energía en la antena (DI₀/RC) en *atprx52Salk* respecto a Col-0 puede operar en el sentido de disminuir la formación de poder reductor y ATP durante la fase fotoquímica. De hecho, el rendimiento cuántico efectivo en PSII (Φ_{PSII}) es menor en *atprx52Salk* que en Col-0 para intensidades de entre 50 y 200 μmol fotones m⁻²s⁻¹ (figura IV.15). A partir de estos resultados, podría deducirse que existe algún tipo de limitación en la salida de fotoasimilados a partir de Calvin, que sin producir disminución de los niveles de ribulosa1,5 bisfosfato (necesaria para mantener Calvin y fotorrespiración), produzca un aumento (por disminución del consumo) de los ratios ATP/ADP y NADPH/NADP⁺. Tanto fotorrespiración como un aumento de la disipación de energía contribuirían a disminuir estos niveles e impedir la aparición indirecta por acumulación de poder reductor, de fenómenos fotooxidativos y fotoinhibición.

Sin embargo el mutante *atprx72Salk* tiene un comportamiento diferente. No aumenta los niveles de disipación respecto a Col-0, pero sin embargo experimenta un aumento en los parámetros φ_{R0}, RE₀/RC y RE₀/CS del test JIP (figuras IV.17 y IV.18), que indican un aumento en el flujo de electrones entre PSII y PSI y hacia los aceptores finales de PSI (Smit *et al.*, 2008; Yusuf *et al.*, 2010). En este sentido, el aumento de la proporción de *Chla/Chlb* en *atprx72Salk* puede indicar un aumento en la proporción PSI/PSII en este mutante (Fiore *et al.*, 2012). Sin embargo, la tasa de asimilación de CO₂ es, al igual que en el caso de *atprx52Salk*, menor que en Col-0; pero, como hemos señalado antes y a diferencia de *atprx52Salk*, no parece que se deba a una estimulación de la fotorrespiración. Por otra parte, se observa que tras tratamientos con MV (figura IV.21) se produce un aumento muy acusado de los parámetros φ_{R0}, RE₀/RC y RE₀/CS en *atprx72Salk*. Puesto que MV actúa como un aceptor artificial de electrones a nivel de PSI, estos resultados indican que existe una limitación en el lado aceptor de PSI, probablemente debida a bajos niveles de ferredoxina o NADP⁺ oxidados. Esto último, puede deberse a una disminución de la actividad del ciclo de Calvin (ya que no parece

haber limitación en la cantidad de CO₂ intercelular disponible). Por otra parte, que se mantenga en *atprx72Salk* un valor elevado de la eficacia cuántica primaria ($\phi_{P_0} = F_v/F_m$) y de todos los parámetros relacionados con el transporte electrónico a lo largo de toda la cadena fotosintética, indican que los electrones son canalizados hacia rutas alternativas de transporte como pueden ser clororrespiración, el ciclo agua-agua (ruta de Halliwell-Asada), o transporte cíclico de electrones.

El ciclo agua-agua funciona como el principal sumidero de electrones bajo condiciones de supresión de la fotosíntesis (Miyake, 2010). En él, el O₂ generado por la fotólisis del agua sufre fotorreducción en la denominada reacción de Mehler y es convertido en radical superóxido O₂⁻. Por medio de la acción de superóxido dismutasa el radical superóxido es convertido en H₂O₂ que posteriormente por medio de una ascorbato peroxidasa regenera el H₂O, cerrándose así el ciclo (Asada, 1999). Park *et al.* (1996) demostraron que el ciclo agua-agua evita o reduce la fotoinhibición del PSII funcionando como un sumidero de electrones. Estos resultados estarían de acuerdo con la ausencia de fenómenos de fotoinhibición a nivel del PSII de *atprx72Salk*, con unos valores de ϕ_{P_0} iguales a Col-0 (figuras IV.17 y IV.18).

Miyake (2010) planteó la acción simultánea del ciclo agua-agua y del flujo cíclico de electrones (CEF, del inglés Cyclic Electron Flow) en un modelo por el cual la combinación de ambos pueden funcionar como un sumidero de electrones en situaciones de disminución de la actividad fotosintética. En resumen, el ciclo agua-agua contribuye a la oxidación del pool de PQ (Miyake y Yokota, 2000) permitiendo la acción del CEF, cuyos requerimiento de un pool de PQ oxidado aumentan bajo condiciones de supresión de fotosíntesis. De esta forma el ciclo agua-agua junto con el CEF permiten un balance redox adecuado en la cadena de transporte de electrones en torno a PSI (Hormann *et al.*, 1994; Makino *et al.*, 2002).

También la clororrespiración puede actuar evitando los fenómenos de disipación (DI₀) y la sobrerreducción de los aceptores del PSI, consumiendo el exceso de NADPH que no se emplea en asimilación de CO₂, eliminando las especies reactivas del oxígeno (ROS) y protegiendo así al PSI de la fotoinhibición. La clororrespiración (Bennoun, 1982) consiste en una corta cadena de transporte electrónico que lleva electrones desde el NADH hasta el oxígeno. Está compuesta por un complejo NADH deshidrogenasa homólogo al complejo I mitocondrial que oxida el NADH y reduce plastoquinona, y una oxidasa terminal que cede electrones de la plastoquinona reducida al oxígeno,

formando agua. La función de esta cadena mantiene una ruta de flujo cíclico insensible a antimicina y participa en mecanismos de respuesta o evitación del estrés (Bennoun, 1982; Casano *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2004; Guéra *et al.*, 2005; Rumeau *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2007).

Como se esquematiza en la figura IV.11, la gran cantidad de fenoles solubles medidos en *atprx72Salk* pueden proporcionar un nivel adicional de fotoprotección debido a su habilidad para consumir poder reductor fotoquímico y para actuar como un sumidero de carbono alternativo (Grace y Logan, 2000; Solecka y Kacperska, 2003). Como se puede también apreciar en la figura IV.23, existen interrelaciones directas entre el metabolismo fenólico y los productos inmediatos de la fotosíntesis, lo que permite un control homeostático a través de los niveles de intermediarios o niveles redox celulares de ambos sistemas (Tzin y Galili, 2010).

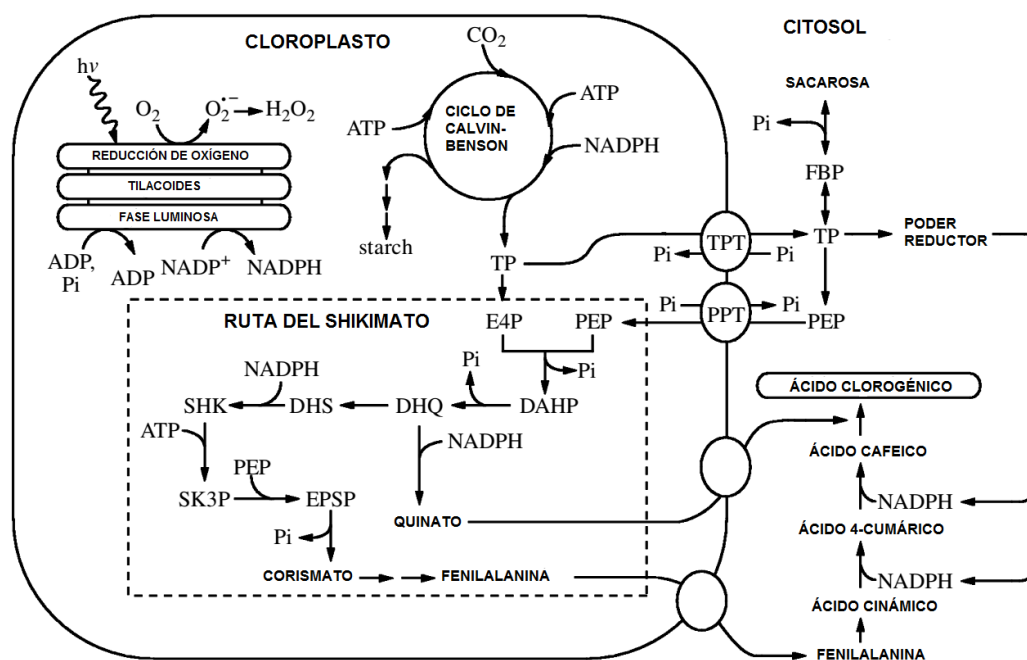


Figura IV.23. Modelo que describe la relación entre el metabolismo de los carbohidratos, la ruta fenilpropanoide y el uso de la energía fotosintética. Los intermediarios de la ruta del shikimato son eritrosa 4-fosfato (E4P), PEP, 3-deoxi-D-arabino-heptulosa 7-fosfato (DAHP), 3-dehidroquinato (DHQ), 3-dehidroshikimato (DHS), shikimato (SHK), shikimato 3-fosfato (SK3P), 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato (EPSP). Los intermediarios del metabolismo del carbono fotosintético incluyen: triose fosfato (TP) y fructosa 1,6-bisfosfato (FBP). Metabolitos translocadores: traslocador de fosfato-TP (TPT) y el traslocador fosfato-PEP (PPT). Adaptado de Grace y Logan (2000).

Cuando se midieron las tasas fotosintéticas bajo condiciones de estrés oxidativo causado por aplicación de MV (figura IV.19A, B), se observaba una reducción drástica de la asimilación de CO₂ en todos los ecotipos respecto a los controles sin tratamiento. Sin embargo, *atprx72Salk* conservaba un mayor porcentaje de actividad fotosintética remanente tras el tratamiento, mostrando una mejor respuesta frente al estrés (figura IV.19C). Como muestran los resultados del test JIP (figuras IV.21 y IV.22), todas las plantas tratadas con MV sufrieron una bajada del rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria del PSII ($\phi_{Po} = F_v/F_m$). Se observó también un aumento en la eficiencia del transporte electrónico hacia el PSI (ϕ_{Eo} y ϕ_{Ro}) muy probablemente producido por la capacidad del MV de captar los electrones de los complejos ferrosulfurados del PSI (Moustaka y Moustakas, 2014). Este aumento era mucho mayor en *atprx72Salk* (figura IV.21E, F; figura IV.22), como ya se ha discutido previamente. Asimismo, el porcentaje de actividad fotosintética remanente tras el tratamiento con MV fue más alto que en Col-0 y *atprx52Salk* (figura IV.19C). Esta mayor resistencia frente al herbicida de *atprx72Salk* puede ser debida: 1. a un aumento de la actividad de las rutas alternativas de transporte electrónico, como se ha discutido previamente; 2. a la mayor producción de compuestos fenólicos que potencialmente pueden proteger a los tejidos del mesófilo del exceso de radiación fotosintéticamente activa, previniendo la fotoinhibición (Solecka y Kacperska, 2003).

En *atprx52Salk* se produjo nuevamente un incremento, pero esta vez mucho mayor, de la disipación (DI₀/RC, DI₀/CS) (figura IV.21E, F; figura IV.22) probablemente debido a la formación de centros de reacción silenciosos (tabla IV.6), que como se ha indicado son un tipo de centros de reacción especiales que disipan en forma de calor toda la energía luminosa que captan y pueden así contribuir a disminuir el estrés fotooxidativo (Strasser *et al.*, 2004).

Los resultados presentados en esta Tesis muestran que la mutación de la peroxidasa 72 reduce el contenido de lignina hasta casi un 40% y retrasa su ciclo vital (Herrero *et al.*, 2013b), pero que, sin embargo, los mutantes llegan a alcanzar un tamaño y producción similar al ecotipo silvestre y además con una mayor resistencia frente al estrés oxidativo (figura IV.19C). A pesar de que *atprx52Salk* tiene una menor resistencia frente al estrés, su comportamiento en condiciones normales es similar a *atprx72Salk*, con una reducción del contenido de lignina parecido (Fernández-Pérez *et al.*, 2013) y una producción al final de su ciclo de vida parecida a Col-0. Esto hace que

la investigación realizada en esta Tesis sobre las peroxidasas 52 y 72 homólogas a ZePrx de *A. thaliana* e implicadas en procesos de lignificación, pueda ser extrapolable a otras especies vegetales para la obtención de plantas de interés agrícola e industrial con bajos contenidos en ligninas pero resistentes a estrés y con una mayor palatabilidad, comestibilidad o idoneidad para la producción de celulosa.

V. Conclusiones Generales

i. Mediante un exhaustivo e innovador análisis bioinformático desde la proteína hasta el gen se ha mostrado que las isoenzimas AtPrx 52 y 72 poseen las peculiares propiedades estructurales y catalíticas de la peroxidasa de *Z. elegans* (ZePrx) y que son compartidas por otras peroxidosas implicadas en la lignificación. Su estructura 2D y 3D, su patrón de glicosilación y su distribución de cargas superficiales indican que ejercen su función en la pared celular. Asimismo las propiedades de sus mRNA sugieren que la traducción se lleva a cabo mediante mecanismos estándar.

ii. De acuerdo con dicho análisis bioinformático, cuando se analizaron los niveles de expresión de estas peroxidosas mediante el análisis de las regiones reguladoras (elementos *cis*) del promotor los resultados mostraron que las hormonas (auxinas, citoquininas, brasinosteroides y giberelinas) regulan probablemente a AtPrx52 y AtPrx72. Asimismo, se encuentran secuencias de reconocimiento de factores de transcripción (NAC, MYB y HD Zip de clase I y III) los cuales están regulados positivamente por las hormonas mencionadas durante el crecimiento secundario. Además, AtPrx52 y AtPrx72 podrían estar reguladas positivamente por NO y H₂O₂. Sus promotores contienen múltiples copias de elementos *cis* que confieren regulación por NO y H₂O₂ (ACGT box, OCS box, OPAQ box, L1BX, MYCL box y W box).

iii. Cuando se obtuvieron mutantes *knockout* de peroxidasa 52 y 72, los individuos mutantes presentaron, en común, una reducción en el contenido de lignina. La función, tipo de regulación o ruta concreta en la que participa cada una de estas dos isoenzimas de peroxidasa es probablemente diferente, ya que los mutantes presentan diferencias relacionadas con los efectos de cada mutación sobre la expresión de la otra isoenzima de peroxidasa; sobre la actividad peroxidasa total; sobre la cantidad de proteínas totales; sobre los niveles de azúcares solubles y sobre los niveles de fenoles solubles.

iv. El principal efecto fenotípico común que tienen los mutantes *atrpx52* y *atrpx72* es una ralentización en el crecimiento en las primeras fases del desarrollo. Estas diferencias fenotípicas tienden a desaparecer a lo largo del tiempo llegando a niveles de

desarrollo similares a Col-0 en etapas avanzadas del ciclo vital. Este efecto puede ser un ajuste homeostático que re-programa el patrón de crecimiento original para compensar la mutación que llevan en su genoma y el déficit en lignina que ésta les provoca. Por tanto, se concluye que la función de cada una de estas dos isoenzimas de peroxidasa, por separado, no es vital para las plantas, ya que a pesar de la reducción en lignina, los mutantes pueden completar su ciclo vital.

v. Cuando se hizo la caracterización de los fenotipos de los mutantes de peroxidasa 52 y 72 en cuanto a su capacidad de fotosíntesis se observó una disminución en su tasa fotosintética de asimilación de CO₂. Este efecto puede proceder de un ajuste metabólico debido a la ralentización del crecimiento que se observa en estos mutantes.

vi. En cada uno de los mutantes se producen ajustes diferentes en la etapa fotoquímica de la fotosíntesis frente a la disminución en la asimilación de CO₂, muy probablemente para evitar la acumulación de poder reductor, lo que revela la existencia de un sistema de inter-regulación entre la fotosíntesis y la lignificación. En *atprx52* existe un aumento de los fenómenos de disipación de la energía luminosa a nivel de la fotoquímica primaria (incluyendo la formación de centros de reacción silenciosos) y probablemente un aumento de fotorrespiración. En *atprx72* existe un aumento aparente del transporte de electrones entre el PSII y el PSI y hacia los aceptores finales del PSI que probablemente refleja un aumento de actividad de rutas alternativas de transporte electrónico que tienden a disminuir la acumulación de poder reductor.

vii. El mutante *atprx72* mostró una mayor resistencia frente a estrés oxidativo que el mutante *atprx52* y que la variedad silvestre Col-0. Mientras que las respuestas de Col-0 y *atprx52* frente a estrés oxidativo son similares, las de *atprx72* son diferentes. Cada una de las respuestas guardan analogía con las adaptaciones de la fase fotoquímica de *atprx52* o de *atprx72*, respectivamente, descritas en el punto anterior.

viii. Los resultados obtenidos en esta Tesis son prometedores para la obtención de plantas de interés agrícola e industrial con bajos contenidos en ligninas, resistentes y con una mayor palatabilidad, comestibilidad o idoneidad para la producción de celulosa.

VI. Bibliografía

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K.** 1997. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.
- Abe M, Takahashi T, Komeda Y.** 2001. Identification of a *cis*-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant J* 26: 487-494.
- Abeles FB, Biles CL.** 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol* 95: 269-273.
- Abeles FB, Dunn LJ, Morgens P, Callahan A, Dinterman RE, Schmidt J.** 1990. Isolation and sequencing of cDNA clones encoding ethylene-induced putative peroxidases from cucumber cotyledons. *Plant Mol Biol* 14: 715-725.
- Abdulrazzak N, Pollet B, Ehltling J, Larsen K, Asnaghi C, Ronseau S, Proux C, Erhardt M, Seltzer V, Renou JP, Ullmann P, Pauly M, Lapierre C, Werck-Reichhart D.** 2006. A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth. *Plant Physiol* 140: 30-48.
- Alonso JM, Ecker JR.** 2006. Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. *Nat Rev Genet* 7: 524-36.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR.** 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-7.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.

- Amthor JS.** 2003. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Ann Bot* 91: 673-695.
- Anterola AM, Lewis NG.** 2002. Trends in lignin modification: A comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221-294.
- Anterola AM, Van Rensburg H, Van Hereden PS, Davin LB, Lewis NG.** 1999. Multisite modulation of flux during monolignol formation in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Biochem Biophys Res Comm* 261: 652-657.
- Aoyama W, Sasaki S, Matsumura S, Mitsunaga T, Hirai H, Tsutsumi Y, Nishida T.** 2002. Sinapyl alcohol-specific peroxidase isoenzyme catalyses the formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol. *J Wood Sci* 497-504.
- Arnon, DI.** 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24: 1-10.
- Armengaud P, Breitling R, Amtmann A.** 2004. The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiol* 136: 2556-2576.
- Asada K.** 1999. The Water-Water Cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:601-639.
- Baier M, Goldberg R, Catesson AM, Francesch C, 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, Dunand C.** 2006. PeroxiBase: a class III plant peroxidase database. *Phytochemistry* 67: 534-9.
- 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, Sederoff RR.** 1993. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260: 672-674.
- Bateman RM, Crane PR, DiMichele WA, Kenrick PR, Rowe NP, Speck T, Stein WE.** 1998. Early evolution of land plants: phylogeny, physiology, and ecology of the primary terrestrial radiation. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 29: 263-292.
- Beerling DJ, Osborne CP, Chaloner WG.** 2001. Evolution of leaf-form in land plants linked to atmospheric CO₂ decline in the late Palaeozoic era. *Nature* 410: 352-354.
- Bellani LM, Guarnieri M, 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.
- Bennoun P.** 1982. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4352-6.
- 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.
- Berner RA.** 1993. Paleozoic atmospheric CO₂: importance of solar radiation and plant evolution. *Science* 261: 68-70.
- Berner RA, Petsch ST, Lake JA, Beerling DJ, Popp BN, Lane RS, Laws EA, Westley MB, Cassar N, Woodward FI, Quick WP.** 2000. Isotope fractionation and atmospheric oxygen: implications for phanerozoic O₂ evolution. *Science* 287: 1630-1633.
- Berthet S, Demont-Caulet N, Pollet B, Bidzinski P, Cézard L, Le Bris P, Borrega N, Hervé J, Blondet E, Balzergue S, Lapierre C, Jouanin L.** 2011. Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Cell* 23: 1124-1137.
- Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M.** 2007. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell* 19:148-62.

- Bilger W y Björkman O. 1990.** Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* 25: 173-185.
- Binns AN, Chen RH, Wood HN, Lynn DG. 1987.** Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: do cell wall components control cell division? *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 980-984.
- Blee KA, Choi JW, O'Connell AP, Schuch W, Lewis NG, Bolwell GP. 2003.** A lignin specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry* 64: 163-176.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003.** Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519-546.
- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A. 1995.** The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res* 23:517-32.
- Bolwell GP, Wojtaszek P. 1997.** Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense-a broad perspective. *Physiol Mol Plant Path* 51: 347-366.
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, Ms Caskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. 2001.** Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13: 1499-1510.
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ. 1992.** Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21-30.
- 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.
- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday, GK. 2001.** Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 524-535.
- Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R, Ros Barceló A. 1993.** Localization of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. *Hort Sci* 28: 38-40.

- Carpin S, Crevecoeur M, de Meyer M, Simon P, Greppin H, Penel C.** 2001. Identification of a Ca²⁺-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *Plant Cell* 13 : 511-520.
- Caruso C, Chilosi G, Leonardi L, Bertini L, Magro P, Buonocore V, Caporale C.** 2001. A basic peroxidase from kernel with antifungal activity. *Phytochemistry* 58 : 743-750.
- Casano LM, Zapata JM, Martín M, Sabater B.** 2000. Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. Plastoquinone as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J Biol Chem* 275: 942-948.
- Cassab GI, Varner JE.** 1988. Cell-wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol* 39: 321-353.
- Castillo FJ.** 1992. Peroxidase and stress. En: Topics and detailed literature on molecular, biochemical and physiological aspect. *Plant peroxidases 1980-1990* (C Penel, T Gaspar, H Greppin, eds). University of Geneva Press, Switzerland, 187-203.
- Cathala B, Chabbert B, Joly C, Dole P, Monties B.** 2001. Synthesis, characterisation and water sorption properties of pectindehydrogenation polymer (lignin model compound) complex. *Phytochemistry* 56: 195-202.
- Ceacero CJ, Díaz-Hernández JL, del Campo AD, Navarro-Cerrillo RM.** 2012. Early assessment of forest restoration techniques using chlorophyll fluorescence and diagnosis of oak (*Quercus ilex sub. ballota*) seedlings vitality. *Bosque* 33: 191-202.
- Chabannes M, Barakate A.** 2001. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *Plant J* 28:257-270.
- Chaffey N, Cholewa E, Regan S, Sundberg B.** 2002. Secondary xylem development in *Arabidopsis*: a model for wood formation. *Physiol Plant* 114: 594-600.
- Chapple CCS, Vogt T, Ellis BE y Somerville CR.** 1992. An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 4: 1413-1424.

- Chen WQ, Singh KB.** 1999. The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* GST6 promoter is mediated in part by an *ocs* element. *Plant J* 19: 667-677.
- Chibbar RN, Cella R y van Huystee RB.** 1984. The heme moiety in peroxidase. *Can J Biochem Cell Biol* 62: 1046-1050.
- Chittoor JM, Leach JE, White FF.** 1997. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 861-871.
- Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Montagu MV, Boerjan W.** 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol* 118: 125-135.
- Christensen JH, Overney S, Rohde A, Diaz WA, Bauw G, Simon P, Van Montagu M, Boerjan W.** 2001. The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant Mol Biol* 47: 581-593.
- Church DL, Galston AW.** 1988. 4-Coumarate: coenzyme A ligase and isoperoxidase expression in *Zinnia* mesophyll cells induced to differentiate into tracheary elements. *Plant Physiology* 88, 679-684.
- Coleman HD, Samuels AL, Guy RD, Mansfield SD.** 2008. Perturbed Lignification Impacts Tree Growth in Hybrid Poplar-A Function of Sink Strength, Vascular Integrity, and Photosynthetic Assimilation. *Plant Physiol* 148: 1229-1237.
- Collen J, Ekdhal A, Abrahamsson K, Pedersen M.** 1994. The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*. *Phytochemistry* 36: 1197-1202.
- Cosgrove DJ.** 2001. Wall structure and wall loosening. A look backwards and peanut forwards. *Plant Physiol* 125: 131-134.
- Cosio C, Dunand C.** 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J Exp Bot* 60: 391-408.
- Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H, Penel C.** 1997. Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochem* 99: 177-186.

- Czaninski Y, Catesson AM.** 1969. Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les tissus conducteurs végétaux au cours du cycle annuel. *J Microscopie* 8: 875-888.
- Dauwe R, Morreel K, Goeminne G, Gielen B, Rohde A, Van Beeumen J, Ralph J, Boudet AM, Kopka J, Rochange SF, Halpin C, Messens E, Boerjan W.** 2008. Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. *Plant J* 52: 263-85.
- Dayan FE, Rimando AM, Duke SO, Jacobs NJ.** 1999. Thiol-dependent degradation of protoporphyrin IX by plant peroxidases. *FEBS Lett.* 444: 227-230.
- Dean JFD, Eriksson KEL.** 1994. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48: 21-33.
- De Gara L.** 2004. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochem Rev* 3: 195-205.
- Demura T, Fukuda H.** 2007. Transcriptional regulation in wood formation. *Trends Plant Sci* 12: 64-70.
- Demura T, Tashiro G, Horiguchi G, Kishimoto N, Kubo M, Matsuoka N, Minami A, NagataHiwatashi 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.
- Derikvand M, Sierra JB, Ruel K, Pollet B, Do CT, Thévenin J, Buffard D, Jouanin L, Lapierre C.** 2008. Redirection of the phenylpropanoid pathway to feruloyl malate in *Arabidopsis* mutants deficient for cinnamoyl-CoA reductase 1. *Planta* 227: 943-56.
- Diehn SH, Burkhart W, Graham JS.** 1993. Purification and partial amino acid sequence of a wound-inducible, developmentally regulated anionic peroxidase from soybean leaves. *Biochem Biophys Res Commun* 195:928-934.
- Dharmawardhana DP, Ellis BE, Carlson JE.** 1995. A β -glucosidase from logdepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol* 107:331-339.

- Donaldson LA.** 1985. Critical assessment of interference microscopy as a technique for measuring lignin distribution in cell walls. *NZ J For Sci* 15: 349-360.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F.** 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- Dudley R.** 1998. Atmospheric oxygen, giant paleozoic insects and the evolution of aerial locomotor performance. *J Exp Biol* 201: 1043-1050.
- Duroux L, Welinder KG.** 2003. The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J Mol Evol* 57: 397-407.
- Dwivedi UN, Campbell WH, Yu J, Datla RSS, Bugos RC, Chiang VL, Podila GK.** 1994. Manipulation of lignin biosynthesis in transgenic tobacco through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*. *Plant Mol Biol* 26: 61-71.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C.** 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349.
- Eisenstadt MA, Bogolitsyn KG.** 2010. Peroxidase oxidation of lignin and its model compounds. *Bioorg Khim* 36: 802-815.
- Ekkehard H, Stitt M.** 1989. Perturbation of photosynthesis in spinach leaf discs by low concentrations of methyl viologen. *Planta* 179: 51-60.
- Espiñeira JM, Novo Uzal E, Gómez Ros LV, Carrión JS, Merino F, Ros Barceló A, Pomar F.** 2011. Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants. *Plant Biol* 13: 59-68.
- Esteban-Carrasco A.** 2005. Peroxidasas en *Aloe barbadensis* M: caracterización y función. Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá (UAH). Alcalá de Henares (Madrid), España.
- Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies, an approach using the Bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fernández-Pérez F, Herrero J, Cuello J, Pomar F, Zapata JM, Pedreño MA, Novo-Uzal E.** 2013. The suppression of *atprx52* affects fibers but not xylem

- lignification in *Arabidopsis* by altering syringyl units proportion. En: XIII Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal (N Vieira, N Saibo y M. Margarida Oliveira, Eds). ITQB - Oeiras, Portugal, pp: 125.
- Ferrer MA, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A.** 1990. Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O₂. A model for the lignification of plant cell walls in the absence of H₂O₂. FEBS Lett 276: 127-130.
- Ferrer MA, Pedreño MA, Ros Barceló A, 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.
- Ferrer MA, Ros Barceló A.** 1994a. Genistein as an endogenous natural substrate of acidic peroxidases in lupin hypocotyls. Ann Appl Biol 125: 173-178.
- Ferrer MA, Ros Barceló A.** 1994b. Control of the lignification in *Lupinus* by genistein acting as superoxide scavenger and inhibitor of the peroxidase-catalyzed oxidation of coniferyl alcohol. J Plant Physiol 144: 64-67.
- Fiore A, Dall'Osto L, Cazzaniga S, Diretto G, Giuliano G, Bassi R.** 2012. A quadruple mutant of *Arabidopsis* reveals a β -carotene hydroxylation activity for LUT1/CYP97C1 and a regulatory role of xanthophylls on determination of the PSI/PSII ratio. BMC Plant Biol 2012 Apr 18: 50.
- Flexas J, Díaz-Espejo A, Berry JA, Cifre J, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbó M.** 2007. Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. J Exp Bot 58: 1533-43.
- Franke R, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Humphreys JM, 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, Chapple C.** 2000. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. Plant J 22: 223-234.

- Fridovich I.** 1997. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272: 18515-18517.
- Fukuda H, 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.** 1996. Xylogenesis: Initiation, progression and cell death. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 299-325.
- Fukuda H.** 2004. Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Rev Mol Cell Biol* 5: 379-391.
- Gabaldón C, Gómez Ros LV, Núñez-Flores MJ, Esteban-Carrasco A, Ros Barceló A.** 2007. Post-translational modifications of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Plant Mol. Biol.* 65: 43-61.
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pedreño MA, Ros Barceló A.** 2005a. 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, Gómez Ros LV, Pedreño MA, Ros Barceló A.** 2005b. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol* 165: 121-30.
- 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.
- Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL.** 1997. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct Biol* 4:1032-1038.
- Gallego-Giraldo L, Escamilla-Trevino L, Jackson LA, Dixon RA.** 2011. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20814-20819.
- Gazarian IG, Lagrimini LM, George SJ, Thorneley RN.** 1996. Anionic tobacco peroxidase is active at extremely low pH: veratryl alcohol oxidation with a pH optimum of 1.8. *Biochem J.* 320: 369-372.

- Gillooly JF, Brown JH, West GB, Savage VM, Charnov EL.** 2001. Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate Science 293: 2248-2251.
- Goldberg R, Liberman M, Mathieu C, Pierron M, Catesson AM.** 1987. Development of epidermal cell wall peroxidases along the mung bean hypocotyl: possible involvement in the cell wall stiffening process. J Exp Bot 38: 1378-1390.
- Gómez Ros LV, Aznar-Asensio G, Hernández JA, Bernal MA, Núñez-Flores MJL, Cuello J y Ros Barceló A.** 2007b. Structural motifs of syringyl peroxidases are conserved during angiosperm evolution. J Agric Food Chem 55:4131-4138
- Gómez Ros LV, Gabaldón C, López Núñez-Flores MJ, Gutiérrez J, Herrero J, Zapata JM, Sottomayor M, Cuello J, Ros Barceló A.** 2012. The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains *cis* elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide. Planta 236: 327-342.
- Gómez Ros LV, Gabaldón C, Pomar F, Merino F, Pedreño MA y Ros Barceló A.** 2007a. Structural motifs of syringyl peroxidases pre-date not only the gymnosperm-angiosperm divergence but also the radiation of tracheophytes. New Phytol 173: 63-78.
- Gómez Ros LV, Paradiso A, Gabaldón C, Pedreño MA, de Gara L, Ros Barceló, A.** 2006. Two distinct cell sources of H₂O₂ in the lignifying *Zinnia elegans* cell culture system. Protoplasma 227: 175-183.
- Govindjee.** 1995. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. Aust J Plant Physiol 22: 131-160.
- Grace SC, Logan BA.** 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 355: 1499-1510.
- Gray JS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP, Montgomery R.** 1996. The glycans of soybean peroxidase. Glycobiology 6: 23-32.
- Green BN, Oliver RWA.** 1991. The study of intact proteins and glycoproteins by electrospray m.s. Biochem Soc Trans 19: 929-935.
- Greppin H, Penel C, Gaspar T.** 1986. Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. University of Geneva Press, Geneva, Switzerland.

- Groover A, Robischon M.** 2006. Developmental mechanisms regulating secondary growth in woody plants. *Curr Opin Plant Biol* 9: 55-58.
- Guéra A, Calatayud A, Sabater B, Barreno E.** 2005. Involvement of the thylakoidal NADH-plastoquinone-oxidoreductase complex in the early responses to ozone exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *J Exp Bot* 56: 205-18.
- Gutiérrez J, López Nuñez-Flores MJ, Gómez Ros LV, Novo-Uzal E, Esteban Carrasco A, Díaz J, Sottomayor M, Cuello J, Ros Barceló A.** 2009. Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Planta* 230: 767-778.
- Hammerschmidt R, Nuckles EM, Kuć J.** 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol Mol Plant P* 20: 73-82.
- Hancock JE, Loya WM, Giardina CP, Li L, Chiang VL, Pregitzer KS.** 2007. Plant growth, biomass partitioning and soil carbon formation in response to altered lignin biosynthesis in *Populus tremuloides*. *New Phytol* 173:732-742.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA.** 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290:2110-2113.
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A.** 2006. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2: 19.
- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ, Chapple C.** 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 38: 765-778.
- Hendriks T, van Loon LC.** 1990. Petunia peroxidase a is localized in the epidermis of aerial plant organs. *J Plant Physiol* 136: 519-525.
- Henkes S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R, Stitt M.** 2001. A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 13: 535-51.

- Henriksen A, Mirza O, Indiani C, Teilum K, Smulevich G, Welinder KG, Gajhede M.** 2001. Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem- apoprotein interactions. *Protein Sci* 10: 108-115.
- Herrmann KM.** 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- Herrero J, Fernández-Pérez F, Yebra T, Novo-Uzal E, Pomar F, Pedreño MÁ, Cuello J, Guéra A, Esteban-Carrasco A, Zapata JM.** 2013b. Bioinformatic and functional characterization of the basic peroxidase 72 from *Arabidopsis thaliana* involved in lignin biosynthesis. *Planta* 237: 1599-1612.
- Herrero J, Esteban-Carrasco A, Zapata JM.** 2013a. Looking for *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol Biochem* 67: 77-86.
- Herrero J, Esteban Carrasco A, Zapata JM.** 2014. *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis: *In silico* promoter analysis and hormonal regulation. *Plant Physiol Biochem* 80: 192-202.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T.** 1999. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 27: 297-300.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi, Matsui H.** 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42: 462-468.
- Hiraga S, Yamamoto K, Ito H, Sasaki K, Matsui H, Honma M, Nagamura Y, Sasaki T, Ohashi Y.** 2000. Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase gene. *FEBS Letters* 471: 245-250.
- Holm KB, Andreasen PH, Eckloff RMG, Kristensen BK, Rasmussen SK.** 2003. Three differentially expressed basic peroxidases from wound-lignifying *Asparagus officinalis*. *J Exp Bot* 54: 2275-2284.
- Hormann H, Neubauer C, Schreiber U.** 1994. An active Mehler-peroxidase sequence can prevent cyclic PSI electron transport in the presence of dioxygen in intact chloroplasts. *Photosynth Res* 57: 61-70.
- Hoyle MC.** 1977. High resolution of peroxidase-indolacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol* 60:787-793.

- Huntley SK, Ellis D, Gilbert M, Chapple C, Mansfield SD.** 2003. Significant increases in pulping efficiency in C4H-F5H transformed poplars: improved chemical savings and reduced environmental toxins. *J Agric Food Chem* 51: 6178-6183.
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, González M, Lee E, Lewis MW, Macwell BB, Perdue TD, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ.** 2006. The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* 18: 3073-3087.
- Irshad M, Canut H, Borderies G, Pont-Lezica R, Jamet E.** 2008. A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: Confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol* 8: 94.
- Jan F, Yamashita K, Matsumoto H, Maeda M.** 2001. Protein and peroxidase changes in various root-cell fractions of two upland rice cultivars differing in Al tolerance. *Environ Exp Bot* 46: 141-146.
- Jespersen HM, Kjaersgard IV, Østergaard L, 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.
- Johansson A, Rasmussen SK, Harthill JE, Welinder KG.** 1992. cDNA, amino acid and carbohydrate sequence of barley seed-specific peroxidase BP 1. *Plant Mol Biol* 18: 1151-1161.
- Jones JD, Henstrand JM, Handa AK, Herrmann KM, Weller, SC.** 1995. Impaired wound induction of 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase and altered stem development in transgenic potato plants expressing a DAHP synthase antisense construct. *Plant Physiol* 108: 1413–1421.
- Joshi CP.** 1987. Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants, a compilation and analysis. *Nucl Acids Res* 15: 9627-9640.
- Jung HJG, Ni W.** 1998. Lignification of plant cell walls: Impact of genetic manipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95: 12742-12743.
- Kajita S, Hishiyama S, Tomimura Y, Katayama Y, Omori S.** 1997. Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the

- activity of 4-coumarate:coenzyme A ligase is depressed. *Plant Physiol* 114:871-879.
- Kawaoka A, Kaothien P, Yoshida K, Endo S, Yamada K, Ebinuma H.** 2000. Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J* 22: 289-301.
- Keller W.** 1995. No end yet to messenger RNA 3' processing. *Cell* 81: 829-832.
- Kim JI, Ciesielski PN, Donohoe BS, Chapple C, Li X.** 2014. Chemically induced conditional rescue of the reduced epidermal fluorescence8 mutant of *Arabidopsis* reveals rapid restoration of growth and selective turnover of secondary metabolite pools. *Plant Physiol* 164: 584-595.
- Kim SY, Chung, HJ, Thomas TL.** 1997. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J* 11: 1237-1251.
- 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-H₂O₂ as the oxidant. *J Wood Sci* 51: 607-614.
- Kok B.** 1948. A critical consideration of the quantum yield of *Chlorella* Photosynthesis. *Enzymologia* 13: 1-56.
- Kok B.** 1949. On the interrelation of respiration and photosynthesis in green plants. *Biochim Biophys Acta* 3: 625-631.
- Kozak M.** 1991a. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* 266: 19867-19870.
- Kozak M.** 1991b. A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr* 1: 111-115.
- Kozaki A, Takeba G.** 1996. Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* 384: 557-560.
- Kozela C, Regan S.** 2003. How plants make tubes. *Trends Plant Sci* 8: 159-164.

- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GF.** 2004. New fluorescence parameters for the determination of Q (A) redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res* 79: 209-218.
- Krause GH, Jahns P.** 2004. Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis. Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: Characterization and function. En: *Advances in photosynthesis and respiration* (G.C.Papageorgiou and Govindjee, Eds). Springer, Dordrecht The Netherlands, 463-495.
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H, Demura T.** 2005. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev* 19: 1855-1860.
- Kvaratskhelia M, Winkel C, Thorneley RN.** 1997. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol* 114: 1237-1245.
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothstein S.** 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis y tissue-specific expression. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 7542-7546.
- Lagrimini LM, Gingas V, Finger F, Rothstein S, Liu TY.** 1997. Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiol* 114: 1187-1196.
- Lagrimini LM y Rothstein S.** 1987. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 84: 438-442.
- Lagrimini LM.** 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol* 96: 577-583.
- Lau S, Jürgens G, De Smet I.** 2008. The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* 20: 1738-1746.
- Lazár D.** 1999. Chlorophyll *a* fluorescence induction, *Biochim. Biophys. Acta* 1412: 1-28.

- Lebedeva OV, Ezhova TA, Musin SM, Radyukina NL, Shestakov SV.** 2003. PXD gene controls synthesis of three anionic peroxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Biology Bull* 30: 124-132.
- Lee D, Meyer K, Chapple C, Douglas CJ.** 1997. Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in *Arabidopsis* leads to altered lignin subunit composition. *Plant Cell* 9: 1985-1998.
- Lee Y, Rubio MC, Alassimone J, Geldner N.** 2013. A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell*. 153: 402-12.
- Lewis NG, Yamamoto E.** 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 455-496.
- Li X, Bonawitz ND, Weng JK, Chapple C.** 2010. The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* is independent of flavonoids. *Plant Cell* 22: 1620-32.
- Li X, Chapple C.** 2010. Understanding lignification: challenges beyond monolignol biosynthesis. *Plant Physiol* 154: 449-452.
- Li J, Jin H.** 2007. Regulation of brassinosteroid signalling. *Trends Plant Sci* 12: 37-41.
- Li Y, Kajita S, Kawai S, Katayama 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 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.
- Lichtenthaler HK.** 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. En: *Method Enzymol* (R Douce, L Packer, Eds). Academic Press Inc, New York, 350-82.
- Long SP, Bernacchi CJ.** 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error *J Exp Bot* 54: 2393-2401.
- Long SP, Farage PK, Garcia RL.** 1996. Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO₂ exchange in the field. *J Exp Bot* 47, 1629-1642.

- López Núñez-Flores MJ, Gutiérrez J, Gómez Ros LV, Novo-Uzal E, Sottomayor M, Ros Barceló A.** 2010. Downregulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans* by gibberellic acid. *J Integr Plant Biol* 52: 244-251.
- López-Serrano M, Fernández MD, Pomar F, Pedreño MA, Ros Barceló A.** 2004. *Zinnia elegans* uses the same peroxidase isoenzyme complement for cell wall lignification in both single-cell tracheary elements and xylem vessels. *J Exp Bot* 55: 423-431.
- Lynn DG, Chen RH, Manning KS, Wood HN.** 1987. The structural characterization of endogenous factors from *Vinca rosea* crown gall tumors that promote cell division of tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 615-619.
- Makino A, Miyake C, Yokota A.** 2002. Physiological functions of the water–water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves . *Plant Cell Physiol* 43: 1017-1026.
- Marjamaa K, Hildén K, Kukkola E, Lehtonen M, Holkeri H, Haapaniemi P, Koutaniemi S, Teeri TH, Fagersdet K, Lundell T.** 2006. Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in lignifying xylem of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol Biol* 61: 719-732.
- Martín M, Casano L, Zapata JM, Guéra A, Del Campo EM, Schmitz-Linneweber C, Maier RM, Sabater B.** 2004. Role of thylakoid Ndh complex and peroxidase in the protection against photo-oxidative stress: fluorescence and enzyme activities in wild-type and ndhF-deficient tobacco. *Physiol Plantarum* 122: 443-452.
- Martínez GA, Civello PM, Chaves AR, Añón MC.** 2001. Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry* 2001 58: 379-87.
- Mathesius U, Schlaman HRM, Spaink HP, Sautter C, Rolfe BG, Djordjevic MA.** 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J* 14: 23-34.
- Matlok J, Krzakowa M, Rudolph H.** 1989. Peroxidase patterns in Bryophytes; A critical evaluation. *Journ Hattori Bot Lab* 67: 407-414.

- Matt P, Krapp A, Haake V, Mock HP, Stitt M.** 2002. Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense RBCS transformants. *Plant J* 30: 663-77.
- Maxwell K, Johnson GN.** 2000. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J Exp Bot* 51: 659-68.
- McCann MC, Defernez M, Urbanowicz BR, Tewari JC, Langewisch T, Olek A, Wells B, Wilson RH, Carpita NC.** 2007 Neural network analyses of infrared spectra for classifying cell wall architectures. *Plant Physiol* 143: 1314-1326.
- McCarthy RL, Zhong R, Ye ZH.** 2011. Secondary wall NAC binding element (SNBE), a key *cis*-acting element required for target gene activation by secondary wall NAC master switches. *Plant Signal Behav* 6: 1282-1285.
- McClure BA, Hagen G, Brown CS, Gee MA, Guilfoyle TJ.** 1989. Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene-cluster in soybean. *Plant Cell* 1: 229-239.
- McDougall GJ.** 1992. Changes in the cell wall associated peroxidases during the lignification of flax fibers. *Phytochemistry* 31: 3385-3389.
- Meng Z, King PH, Nabors LB, Jackson NL, Chen CY, Emanuel PD, Blume SW.** 2005. The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses capdependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 33: 2962-2979.
- Meyer RC, Steinfath M, Lisek J, Becher M, Witucka-Wall H, Törjék O, Fiehn O, Eckardt A, Willmitzer L, Selbig J, Altmann T.** 2007. The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 4759-64.
- Milloni D, Sado PE, Stacey NJ, Roberts K, McCann M.** 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.

- Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M.** 2005. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell* 17: 2993-3006.
- Miyake C.** 2010. Alternative electron flows (water-water cycle and cyclic electron flow around PSI) in photosynthesis: molecular mechanisms and physiological functions. *Plant Cell Physiol* 51: 1951-63.
- Miyake C, Yokota A.** 2000. Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water–water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiol* 41: 335-343.
- Mohan R, Bajar AM, Kolattukudy PE.** 1993. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (tap 1) by wounding in transgenic tobacco and activation of tap1/GUS and tap2/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. *Plant Mol Biol* 12: 341-354.
- Moustaka J, Moustakas M.** 2014. Photoprotective mechanism of the non-target organism *Arabidopsis thaliana* to paraquat exposure. *Pestic Biochem Phys On line*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.04.006>.
- Munday JC, Govindjee.** 1969a. Fluorescence transients in *Chlorella*: effects of supplementary light, anaerobiosis and methyl viologen, *Prog Photosynth Res* 2: 913-922.
- Munday JC, Govindjee.** 1969b. Light-induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll a *in vivo*; III. The dip and the peak in the fluorescence transient of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biophys J* 9: 1-21.
- Narsai R, Howell KA, Millar AH, O'Toole N, Small I, Whelan J.** 2007. Genomewide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell* 19: 3418-3436.
- Nei M, Kumar S.** 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, Oxford.
- Neuhaus JM.** 1996. Protein targeting to the plant vacuole. *Plant Physiol Biochem* 34: 217-221.
- Newman TC, Ohmetakagi M, Taylor CB, Green PJ.** 1993. DST sequences, highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco. *Plant Cell* 5: 701-714.

- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G.** 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10: 1-6.
- Nielsen KL, Indiani C, Henriksen A, Feis A, Becucci M, Gajhede M, Smulevich G, Welinder KG.** 2001. Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. *Biochemistry-US* 40: 11013-11021.
- Nieminen K.M, Kauppinen L, Helariutta Y.** 2004. A weed for wood? *Arabidopsis* as a genetic model for xylem development. *PlantPhysiol* 135: 653-659
- Nose M, Bernards MA, Furlan M, Zajicek J, Eberhardt TL, Lewis NG.** 1995. Towards the specification of consecutive steps in macro-molecular lignin assembly. *Phytochemistry* 39: 71-79.
- Novo-Uzal E, Fernández-Pérez F, Herrero J, Gutiérrez J, Gómez Ros LV, Bernal MÁ, Díaz J, Cuello J, Pomar F, Pedreño MÁ.** 2013. From *Zinnia* to *Arabidopsis*: approaching the involvement of peroxidases in lignification. *J Exp Bot* 64: 3499-518.
- Novo-Uzal E, Gómez Ros LV, Pomar F, Bernal MA, Paradela A, Albar JP, Ros Barcelo A.** 2009. The presence of sinapyl lignin in *Ginkgo biloba* cell cultures changes our views of the evolution of lignin biosynthesis. *Physiol Plant* 135: 196-213.
- Oda Y, Mimura T, Hasezawa S.** 2005. Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol* 137:1027-1036.
- Ogawa K, Kanematsu S, Asada K.** 1997. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol* 38: 1118-1126.
- Oh S, Park S, Han KH.** 2003. Transcriptional regulation of secondary growth in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 54: 2709-2722.

- Oh SA, Park JH, Lee GI, Paek KH, Park SK, Nam HG.** 1997. Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 12: 527-35.
- Ohashi-Ito K, Kubo M, Demura T, Fukuda H.** 2005. Class III homeodomain leucine-zipper proteins regulate xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol* 46: 1646-1656.
- Ohmetakagi M, Taylor CB, Newman TC, Green PJ.** 1993. The effect of sequences with high au content on messenger-RNA stability in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 11811-11815.
- Orr JD, Lynn DG.** 1992. Biosynthesis of dehydrodiconiferyl alcohol glucosides: implications for the control of tobacco cell growth. *Plant Physiol* 98: 343-352.
- Osakabe K, Koyama H, Kawai S, Katayama Y, Morohoshi N.** 1994. Molecular cloning and the nucleotide sequences of two novel cDNAs that encode anionic peroxidases of *Populus kitakammiensis*. *Plant Sci* 103: 167-175.
- Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP, Chang VL.** 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 8955-8960.
- Østergaard L, Pedersen AG, Jespersen HM, Brunak S, Welinder KG.** 1998. Computational analyses and annotations of the *Arabidopsis* peroxidase gene family. *FEBS Lett* 433: 98-102.
- Østergaard L, Teilum K, Mirza O, Mattsson O, Petersen M, Welinder KG, Mundy J, Gajhede M, Henriksen A.** 2000. *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol Biol* 44: 231-243.
- Østergaard L, Yanofsky MF.** 2004. Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 39: 682-696.
- Palmieri MC, Sell S, Huang X, Scherf M, Werner T, Durner J, Lindermayr C.** 2008. Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J Exp Bot* 59: 177-186.

- Papageorgiou GC, Tsimilli-Michael M, Stamatakis K.** 2007. The fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint, *Photosynth Res* 94: 275-290.
- Park YI, Chow WS, Osmond CB, Anderson JM.** 1996. Electron transport to oxygen mitigates against the photoinactivation of Photosystem II *in vivo*. *Photosynth Res* 50: 23-32.
- Park JE, Park JY, Kim YS, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim SY, Kim J, Lee YH, Park CM.** 2007. GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 282: 10036-46.
- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C.** 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65: 1879-1893.
- Passardi F, Dobias J, Valério L, Guimil S, Penel C, Dunand C.** 2007. Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *J Plant Physiol* 164: 980-992.
- Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, Suman C, Newman LJ, Smith C, Bevan MW, Mansfield S, Whetten RW, Sederoff RR, Campbell MM.** 2003. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J* 36: 743-754.
- Pedreño MA, Bernal MA, Calderón AA, Ferrer MA, López-Serrano M, Merino de Cáceres F, Muñoz R, Ros Barceló A.** 1993. A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in Vitaceae, Solanaceae and Leguminosae. *Plant Peroxidases: Biochem Physiol*. Ed. KJ Welinder, SK Rasmussen, C Penel y H Greppin, Universidad de Ginebra, Ginebra. 307-314.
- Peng SSY, Chen CYA, Xu NH, Shyu AB.** 1998. RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J* 17: 3461-3470.
- Pérez-Amador MA, Lidder P, Johnson MA, Landgraf J, Wisman E, Green PJ.** 2001. New molecular phenotypes in thedstmutants of arabidopsis revealed by DNA microarray analysis. *Plant Cell* 13: 2703-2717.
- PeroxiBase.** 2014. PeroxiBase: The peroxidases database (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr>)
- Piquemal J, Lapierre C, Myton K, O'Connell A, Schuch W, GrimaPettenati J, Boudet AM.** 1998. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces

- significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J* 13: 71–83.
- Podell S, Gribskov M.** 2004. Predicting N-terminal myristoylation sites in plant Proteins. *BMC Genomics* 5: 37.
- Polle A, Otter T, Seifert F.** 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol* 106: 53-60.
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Ros Barceló A, Amaanda I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier H, Valpuesta V.** 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122: 1119-1127.
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W.** 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 1051-1071.
- Ragni L, Nieminen K, Pacheco-Villalobos D, Sibout R, Schwechheimer C, Hardtke CS.** 2011. Mobile gibberellin directly stimulates *Arabidopsis* hypocotyl xylem expansion. *Plant Cell* 23: 1322-36.
- Ralph J, Bunzel M, Marita JM, Hatfield RD, Lu F, Kim H, Schatz PF, Grabber JH, Steinhart H.** 2004. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem Rev* 3: 79-96.
- Rasmussen SK, Welinder KG, Hejgaard J.** 1991. cDNA cloning, characterization and expression of an endosperm-specific barley peroxidase. *Plant Mol Biol* 16: 317-327.
- Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K.** 2001. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 52: 35-41.
- Roberts E, Kolattukudy PE.** 1989. Molecular cloning, nucleotide sequence, and abscisic acid induction of a suberization-associated highly anionic peroxidase. *Mol Gen Genet* 217: 223-232.
- Roberts K, McCann MC.** 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. *Curr Opin Plant Biol* 3: 517-522.

- Rogers LA, Dubos C, Surman C, Willment J, Cullis IF, Mansfield SD, Campbell MM.** 2005. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytol* 168: 123-140.
- Rogers JC, Lanahan MB, Rogers SW.** 1994. The *cis*-acting gibberellin response complex in high pI alpha-amylase gene promoters. Requirement of a coupling element for high-level transcription. *Plant Physiol* 105: 151-158.
- Rohde A, Morreel K, Ralph J, Goeminne G, Hostyn V, De Rycke R, Kushnir S, Van Doorselaere J, Joseleau JP, Vuylsteke M, Van Driessche G, Van Beeumen J, Messens E, Boerjan W.** 2004. Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell* 16: 2749-2771.
- Ros Barceló A.** 1995. Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma* 186: 41-44.
- Ros Barceló A.** 1997. Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* 176: 87-132.
- Ros Barceló A.** 1998a. Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Ann Bot* 82: 97 -103.
- Ros Barceló A.** 1998b. The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. *Planta* 207: 207-216.
- Ros Barceló, A.** 2005. Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta* 220: 747-756.
- Ros Barceló A, Ferrer MA, García-Florenciano E, 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, Esteban-Carrasco A.** 2007. Looking for syringyl peroxidases. *Trends Plant Sci* 12: 486-491.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Ferrer MA, Hernández JA.** 2006. The apoplastic antioxidant enzymatic system in the wood-forming tissues of trees. *Trees* 20: 145-156.

- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS, Pedreño MA.** 2004. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? *Phytochem Rev* 3: 61-78.
- Ros Barceló A, Morales M, Pedreño MA.** 1997. Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. *Lignin and Lignan Biosynthesis*, N.G. Lewis and S. Sarkanen, eds, ACS Symposium Series, ACS, Washington 697: 84-95.
- Ros Barceló A, Muñoz R.** 1989. Epigenetic control of a cell wall scopoletin peroxidase by lupinoflavone in *Lupinus*. *Phytochemistry* 28: 1331-1333.
- Ros Barceló A, Muñoz R, Sabater F.** 1987. Lupin peroxidases. I. Isolation and characterization of cell wall bound isoperoxidase activity. *Physiol Plant* 71: 448-454.
- Ros Barceló A, Paradiso A, Pomar F.** 2003. 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 “12th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry” pp 253-256, Madison, Wisconsin USA.
- Ros Barceló A, Muñoz R, Sabater F.** 1988. Lupin peroxidases III. Subcellular location of membrane-bound acidic isoperoxidases. *Plant Physiol Biochem* 26: 575-583.
- Ros Barceló A, Pomar F.** 2001. Oxidation of cinnamyl and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. *Phytochemistry*. 57: 1105-1113.
- Ros Barceló A, Pomar F, Ferrer MA, Martínez P, Ballesta MC, Pedreño MA.** 2002b. *In situ* characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiol Plant* 114: 33-40.
- Ros Barceló A, Pomar F, López-Serrano M, Martínez P, Pedreño MA.** 2002a. Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiol Biochem* 40: 325-332.

- Ros Barceló A, Pomar F, Pedreño MA.** 2000. Competitive inhibitor-dissected histochemistry of the peroxidase responsible for syringyl lignin biosynthesis in *Z. elegans* xylem. *Aust J Plant Phys* 27: 1101-1107.
- Rumeau D, Peltier G, Cournac L.** 2007. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* 30: 1041-51.
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QXJ.** 2010. WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 15: 247-258.
- Saitou N, Nei M.** 1987. The neighbor-joining method, A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sakai H, Aoyama T, Oka A.** 2000. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* 24: 703-711.
- Sato Y, Sugiyama M, Komamine A, 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, Fukuda H.** 1995b. Purification of cationic peroxidases bound ionically to cell walls from the roots of *Zinnia elegans*. *J Plant Res* 108: 463-468.
- Schuller DJ, Ban N, Huystee RB, McPherson A, Poulos TL.** 1996. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4: 311-321.
- Sewalt VJH, Hi W, Blount JW, Jung HG, Masoud SA, Howles PA, Lamb C, Dixon RA.** 1997. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol* 115: 41-50.
- Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, Jouanin L, Séguin A.** 2005. *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C* and *-D* are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 2059-2076.
- Siegel BZ.** 1993. Plant peroxidases-an organismic perspective. *Plant Growth Regul* 12: 303-312.

- Sharp RE, Matthews MA, Boyer JS.** 1984. Kok effect and the quantum yield of photosynthesis: light partially inhibits dark respiration. *Plant Physiol* 75: 95-101.
- Shigeoka S, Nakano Y, Kitaoka S.** 1980. Purification and properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis* Z. *Arch Biochem Biophys* 201:121-127.
- Shivakumar PD, Geetha HM, Shetty HS.** 2003. Peroxidase activity and isozyme analysis of pearl millet seedlings and their implications in downy mildew disease resistance. *Plant Sci*, 164: 85-93.
- Smit MF, Krüger GHJ, van Heerden PDR, Pienaar JJ, Weissflog L.** 2008. Effect of Trifluoroacetate, a Persistent Degradation Product of Fluorinated Hydrocarbons, on C3 and C4 Crop Plants. En: *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis*. R. J. Strasser J.F. Allen, E. Gantt, J.H. Golbeck, and B. Osmond (eds.), 1501–1504. Springer. The Netherlands.
- Smith C, Rodgers M, Zimmerlin A, Ferdinando D, Bolwell G.** 1994. Tissue and subcellular immunolocalization of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyl tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Planta* 192: 155-164.
- Solecka D, Kacperska A.** 2003. Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold. *Physiol. Plantarum* 119: 253-262.
- Sottomayor M, Ros Barceló A.** 1997. What can we learn from α -3', 4'-anhydrovinblastine synthase? *Recent Res Devel Phytochem* 1: 225-233.
- Sperry JS.** 2000. Hydraulic constraints on plant gas exchange, *Agr. Forest. Meteorol* 104: 13-23.
- Sreenivasulu N, Ramanjulu S, Ramachandra-Kini K, Prakash HS, Shetty HS, Savithri HS, Sudhakar C.** 1999. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. *Plant Sci*, 141:1-9.
- Srivastava A, Greppin H, Strasser RJ.** 1995. Acclimation of land plants to diurnal changes in temperature and light. En: P. Mathis (Ed.), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, vol. 4, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 909-912.

- Stirbet A, Govindjee. 2011.** On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J Photochem Photobiol B* 104: 236-57.
- Stirbet A, Govindjee. 2012.** Chlorophyll *a* fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth Res* 113: 15-61.
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. 2000.** The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples, En: "Probing photosynthesis: Mechanism, regulation and adaptation" (Yunus M, Pathre U, Mohanty P, eds) 443-480. Taylor and Francis, London, UK.
- Strasser BJ, Strasser RJ. 1995.** Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. En: "Photosynthesis: from Light to Biosphere" (Mathis P, ed) 5: 977-980. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M. 1998.** Activity and heterogeneity of PSII probed in vivo by the chlorophyll *a* fluorescence rise O-(K)-J-I-P. En: "Photosynthesis: Mechanisms and Effects", (Garab G, ed), 5: 4321-4324. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. 2004.** Analysis of the Chlorophyll *a* Fluorescence Transient. En: "Chlorophyll fluorescence: A Signature of Photosynthesis" (Papageorgiou GC, Govindjee, Eds), *Advances in Photosynthesis and Respiration Series* 19: 321-362. Kluwer Academic Publishers, Rotterdam, The Netherlands.
- Stuhlfauth T, Sültemeyer DF, Weinz S, Fock HP. 1988.** Fluorescence Quenching and Gas Exchange in a Water Stressed C(3) Plant, *Digitalis lanata*. *Plant Physiol* 86: 246-50.
- Šukalović VHT, Vuletić M. 2003.** The characterization of peroxidases in mitochondria of maize roots. *Plant Sci* 164: 999-1007.
- Sullivan ML, Green PJ. 1996.** Mutational analysis of the DST element in tobacco cells and transgenic plants: identification of residues critical for mRNA instability. *RNA* 2: 308-315.

- 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.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
- Terashima N, 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.
- Teutonico RA, Dudley MW, Orr JD, Lynn DG, Binns AN.** 1991. Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 97:288-297.
- Tixier A, Cochard H, Badel E, Dusotoit-Coucaud A, Jansen S, Herbette S.** 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model species for xylem hydraulics: does size matter? *J Exp Bot* 64: 2295-305.
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P.** 2002. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288: 129-138.
- Tsimilli-Michael M, Pêcheux M, Strasser RJ.** 1998. Vitality and stress adaptation of the symbionts of coral reef and temperate foraminifers probed *in hospite* by the fluorescence kinetics OJ-I-P. *Archs. Sci. Genève* 51: 1-36.
- 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.

- Turlapati PV, Kim KW, Davin LB, Lewis NG.** 2011. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta* 233: 439-470.
- Tuzet A, Perrier A, Leuning R.** 2003. A coupled model of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration. *Plant Cell and Environment* 26: 1097-1116.
- Tzin V, Galili G.** 2010. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol Plant* 3: 956-72.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ.** 1997. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276: 1865-1868.
- Valério L, De Meyer M, Penel C, Dunand C.** 2004. Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry* 65:1331-1342.
- Vanden Driessche T, Kevers C, Gaspar T, Caubergs R.** 1984. Peroxidases in *Acetabularia*: their possible role in development. *Differentiation* 27: 175-181.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD.** 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agr Food Chem* 46: 4113-4117.
- Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL.** 2008. Integration of auxin and brassinosteroid pathways by auxin response factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9829-9834.
- Voelker SL, Lachenbruch B, Meinzer FC, Kitin P, Strauss SH.** 2011. Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival. *Plant Cell Environ* 34: 655-668.
- von Caemmerer S, Farquhar GD.** 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-87.
- Wallace G, Fry SC.** 1999. Action of diverse peroxidases and lacasses on six cell wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry* 52: 769-773.
- Walling LL.** 2006. Recycling or regulation? The role of amino-terminal modifying enzymes. *Curr Opin Plant Biol* 9: 227-233.
- Wang, YH.** 2008. How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*? *J. Biochem. Technol* 1: 11-20.

- Weaver LM, Herrmann KM.** 1997. Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends Plant Sci* 9: 346-351.
- Weger HG.** 1997. Interactions between Cu(II), Mn(II) and salicylhydroxamic acid in determination of algal peroxidase activity. *Phytochemistry* 46: 195-201.
- Welinder KG.** 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.
- Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgard IV, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM, Duroux L.** 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*, *Eur J Biochem* 269: 6063-6081.
- Weng JK, Chapple C.** 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol* 187: 273-285.
- Weng JK, Li X, Stout J, Chapple C.** 2008. Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 105: 7887-7892.
- Wickens M.** 1990. How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus, *Trends Biochem. Sci* 15: 277-281.
- Wolf YI, Rogozin IB, Grishin NV, Tatusov RL, Koonin EV.** 2001. Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades, *BMC Evol Biol* 1: 8.
- Xu NF, Hagen G, Guilfoyle T.** 1997. Multiple auxin response modules in the soybean SAUR 15A promoter. *Plant Sci* 126: 193-201.
- Xu Z, Zhang D, Hu J, Zhou X, Ye X, Reichel KL, Stewart NR, Syrenne RD, Yang X, Gao P, Shi W, Doepcke C, Sykes RW, Burris JN, Bozell JJ, Cheng MZ, Hayes DG, Labbe N, Davis M, Stewart CN, Yuan JS.** 2009. Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics* 10, Suppl 11:S3.
- Yamaguchi M, Kubo M, Fukuda H, Demur, T.** 2008. Vascular related NAC DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in *Arabidopsis* roots and shoots. *Plant J* 55: 652-664.

- Ye Y, Jaroszewski L, Li W, Godzik A.** 2003. A segment alignment approach to protein comparison. *Bioinformatics* 19: 742-749.
- Yubedee A.** 1998. Role of polyphenol oxidase, peroxidase and total phenol content in differential resistance of *Dioscorea* species to *Fusarium moniliforme*. *Indian J Agr Sci* 68: 644-666.
- Yubedee AG, Arinze AE.** 1994. Discriminatory adsorption of polygalacturonases of two isolates of *Fusarium moniliforme* on plant tissues and the effect on the host range of fungal isolates. *Int J Tropical Plant Diseases* 12: 67-74.
- Yusuf MA, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Govindjee, Sarin NB.** 2010. Overexpression of gamma-tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1428-38.
- Zapata JM, Sabater B, Martín M.** 1998. Identification of a thylakoid peroxidase of barley which oxidizes hydroquinone. *Phytochemistry* 48: 1119-1123.
- Zapata JM, Gasulla F, Esteban-Carrasco A, Barreno E, Guéra A.** 2007. Inactivation of a plastid evolutionary conserved gene affects PSII electron transport, life span and fitness of tobacco plants. *New Phytol* 174: 357-66.
- Zhang J, Elo A, Helariutta Y.** 2011. *Arabidopsis* as a model for wood formation. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 293-299.
- Zhang ZL, Xie Z, Zou X, Casaretto J, Ho TH, Shen QJ.** 2004. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiol* 134: 1500-1513.
- Zhao C, Craig JC, Petzold HE, Dickerman AW, Beers EP.** 2005. The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the *Arabidopsis* root-hypocotyl. *Plant Physiol* 138: 803-818.
- Zhao Q, Dixon RA.** 2011. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? *Trends Plant Sci* 16: 227-33.
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye ZH.** 2008. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 2763-2782.

Anexos

Anexos

cDNA												
AtPrx	cDNA(bp)	A (nº/%)	C (nº/%)	G (nº/%)	U (nº/%)	GC%	AT%	ΔG cDNA/bp	ΔG cDNA/A	ΔG cDNA/C	ΔG cDNA/G	ΔG cDNA/U
4	1219	348/29	265/22	244/20	362/30	41,8	58,2	-0,230	-0,807	-1,059	-1,150	-0,775
5	966	284/29	209/22	229/24	244/25	45,3	54,7	-0,268	-0,912	-1,239	-1,131	-1,062
52	1222	322/26	311/25	254/21	335/27	46,2	53,8	-0,236	-0,897	-0,929	-1,138	-0,863
67	1220	327/27	309/25	262/21	322/27	46,8	53,2	-0,248	-0,924	-0,978	-1,153	-0,939
68	1194	311/26	308/26	272/23	303/25	48,6	51,4	-0,267	-1,025	-1,035	-1,171	-1,052
36	1261	347/28	252/20	280/22	382/30	42,2	57,8	-0,264	-0,961	-1,323	-1,191	-0,873
14	1014	276/27	233/23	250/25	255/25	48	52	-0,291	-1,068	-1,266	-1,180	-1,156
49	1215	328/27	263/22	271/22	353/29	44	56	-0,272	-1,008	-1,257	-1,220	-0,936
72	1220	345/28	285/23	250/20	340/28	43,9	56,1	-0,237	-0,839	-1,016	-1,158	-0,851
CDS												
AtPrx	CDS (bp)	A (nº/%)	C (nº/%)	G (nº/%)	U (nº/%)	GC%	AT%	ΔG CDS/bp	ΔG CDS/A	ΔG CDS/C	ΔG CDS/G	ΔG CDS/U
4	948	253/27	223/24	214/23	258/27	46,1	53,9	-0,262	-0,983	-1,115	-1,162	-0,964
5	966	284/29	209/22	229/24	244/25	45,3	54,7	-0,268	-0,912	-1,239	-1,131	-1,062
52	975	254/26	272/28	221/23	228/23	50,6	49,4	-0,256	-0,982	-0,917	-1,129	-1,094
67	951	236/25	257/27	228/24	230/24	51	49	-0,279	-1,122	-1,031	-1,162	-1,152
68	978	223/23	277/28	249/25	229/23	53,8	46,2	-0,303	-1,327	-1,069	-1,189	-1,293
36	1035	282/27	226/22	242/23	285/28	45,2	54,8	-0,273	-1,002	-1,250	-1,167	-0,991
14	1014	276/27	233/23	250/25	255/25	48	52	-0,291	-1,068	-1,266	-1,180	-1,156
49	996	270/27	232/23	235/24	259/26	47	53	-0,286	-1,053	-1,226	-1,210	-1,098
72	1011	276/27	251/25	222/22	262/26	46,8	53,2	-0,255	-0,935	-1,028	-1,162	-0,985
5'UTR												
AtPrx	5'UTR(bp)	A (nº/%)	C (nº/%)	G (nº/%)	U (nº/%)	GC%	AT%	ΔG 5'UTR/bp	ΔG 5'UTR/A	ΔG 5'UTR/C	ΔG 5'UTR/G	ΔG 5'UTR/U
4	105	41/39	20/19	6/6	38/36	24,8	75,2	-0,081	-0,207	-0,425	-1,417	-0,224
5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
52	56	21/38	11/20	4/7	20/36	26,8	73,2	-0,018	-0,048	-0,091	-0,250	-0,050
67	81	35/43	11/14	17/21	18/22	34,6	65,4	-0,142	-0,329	-1,045	-0,676	-0,639
68	61	35/57	11/18	6/10	9/15	27,9	72,1	0,007	0,011	0,036	0,067	0,044
36	20	8/40	4/20	4/20	4/20	40	60	0,035	0,088	0,175	0,175	0,175
14	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
49	49	13/27	14/28	4/8	18/37	37	63	-0,049	-0,185	-0,171	-0,600	-0,133
72	62	29/47	15/24	9/15	9/15	38,7	61,3	-0,019	-0,041	-0,080	-0,133	-0,133
3'UTR												
AtPrx	3'UTR(bp)	A (nº/%)	C (nº/%)	G (nº/%)	U (nº/%)	GC%	AT%	ΔG 3'UTR/bp	ΔG 3'UTR/A	ΔG 3'UTR/C	ΔG 3'UTR/G	ΔG 3'UTR/U
4	166	54/33	22/13	24/14	66/40	27,7	72,3	-0,088	-0,272	-0,667	-0,612	-0,222
5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
52	191	47/25	28/15	29/15	87/46	29,8	70,2	-0,146	-0,594	-0,996	-0,962	-0,321
67	188	56/30	41/22	17/9	74/39	30,9	69,1	-0,071	-0,238	-0,325	-0,784	-0,180
68	155	53/34	20/13	17/11	65/42	23,9	76,1	-0,112	-0,326	-0,865	-1,018	-0,266
36	206	57/28	22/11	34/17	93/45	27,2	72,8	-0,157	-0,566	-1,467	-0,949	-0,347
14	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
49	170	45/26	17/10	32/19	76/25	49/29	121/71	-0,149	-0,563	-1,490	-0,792	-0,333
72	147	40/27	19/13	19/13	69/47	25,9	74,1	-0,107	-0,392	-0,825	-0,825	-0,227
Intron 1												
AtPrx	Intron1 (bp)	A (nº/%)	C (nº/%)	G (nº/%)	U (nº/%)	GC%	AT%	ΔG Intron1/bp	ΔG Intron1/A	ΔG Intron1/C	ΔG Intron1/G	ΔG Intron1/U
4	112	27/24,11	11/9,82	16/14,285	58/51,785	24,1	75,9	-0,168	-0,696	-1,709	-1,175	-0,324
5	85	28/32,941	12/14,117	7/8,235	38/44,705	22,4	77,6	-0,045	-0,136	-0,317	-0,543	-0,100
52	110	24/21,82	17/15,454	14/12,727	55/50	28,2	71,8	-0,082	-0,376	-0,531	-0,644	-0,164
67	98	33/33,673	16/16,327	16/16,327	33/33,673	32,7	67,3	-0,131	-0,388	-0,800	-0,800	-0,388
68	139	40/28,777	16/11,511	24/17,266	59/42,446	28,8	71,2	-0,158	-0,549	-1,371	-0,914	-0,372
36	95	30/31,58	8/8,421	18/18,947	39/41,052	27,4	72,6	-0,121	-0,383	-1,438	-0,639	-0,295
14	94	34/36	13/14	14/15	33/35	29	71	-0,084	-0,231	-0,604	-0,561	-0,238
49	80	22/28	8/10	13/16	37/46	26	74	-0,218	-0,791	-2,175	-1,338	-0,470
72	97	31/31,96	15/15,464	13/13,402	38/39,175	28,9	71,1	-0,108	-0,339	-0,701	-0,809	-0,277
Intron 2												
AtPrx	Intron2 (bp)	A (nº/%)	C (nº/%)	G (nº/%)	U (nº/%)	GC%	AT%	ΔG Intron2/bp	ΔG Intron2/A	ΔG Intron2/C	ΔG Intron2/G	ΔG Intron2/U
4	221	76/34,39	29/13,122	21/9,502	95/42,986	22,6	77,4	-0,134	-0,389	-1,020	-1,409	-0,311
5	89	33/37,078	16/17,978	8/8,988	32/35,955	27	73	-0,126	-0,339	-0,700	-1,400	-0,350
52	89	26/29,214	15/16,854	14/15,73	34/38,202	32,6	67,4	-0,100	-0,342	-0,593	-0,636	-0,262
67	441	131/29,70	85/19,274	55/12,472	170/38,54	31,7	68,3	-0,136	-0,457	-0,705	-1,089	-0,352
68	494	141/28,54	80/16,194	71/14,372	202/40,89	30,6	69,4	-0,132	-0,462	-0,815	-0,918	-0,323
36	80	29/36,25	13/26,25	9/11,25	29/36,25	27,5	72,5	0,119	-0,328	-0,731	-1,056	-0,328
14	78	10/13	14/18	14/18	40/51	36	64	-0,086	-0,670	-0,479	-0,479	-0,168
49	76	20/26	17/22	12/16	27/36	28	62	-0,162	-0,615	-0,724	-1,025	-0,456
72	74	33/44,595	12/16,216	7/9,46	22/29,73	25,7	74,3	-0,072	-0,161	-0,442	-0,757	-0,241
Intron 3												
AtPrx	Intron3 (bp)	A (nº/%)	C (nº/%)	G (nº/%)	U (nº/%)	GC%	AT%	ΔG Intron3/bp	ΔG Intron3/A	ΔG Intron3/C	ΔG Intron3/G	ΔG Intron3/U
4	87	25/28,736	23/26,437	10/11,494	29/33,333	37,9	62,1	0,103	-0,360	-0,391	-0,900	-0,310
5	157	52/33,121	21/13,376	20/12,739	64/40,764	26,1	73,9	0,151	-0,457	-1,130	-1,187	-0,371
52	504	165/32,74	79/15,674	56/11,111	204/40,47	26,8	73,2	-0,173	-0,527	-1,101	-1,553	-0,426
67	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
68	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
36	241	97/40,25	26/10,788	34/14,11	84/34,854	24,9	75,1	-0,112	-0,279	-1,042	-0,797	-0,323
14	109	36/33	21/19	19/17	33/30	37	63	-0,142	-0,431	-0,738	-0,816	-0,646
49	118	38/32	11/9	11/9	37/31	36	64	-0,048	-0,150	-0,738	-0,518	-0,178
72	85	31/36,471	14/16,471	8/9,411	32/37,647	25,9	74,1	-0,068	-0,186	-0,412	-0,721	-0,180

Anexo 1. Contenido y composición de bases, y energía libre (ΔG) de los cDNA, CDS, UTRs e intrones de cada AtPrx. Los cálculos fueron hechos a mano a partir de la información disponible en las bases de datos (ver materiales y métodos del capítulo I).

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Control		
	Col-0	<i>atprx52Salk</i>	<i>atprx72Salk</i>
F extremos			
F ₀	302±11,476 ^a	353,327±9,81 ^b	265,371±11,958 ^c
F _m	1652,632±28,166 ^a	1640,885±24,077 ^a	1670,857±29,348 ^a
F _v	1350,632±27,039 ^{ab}	1287,558±23,114 ^a	1405,486±28,174 ^b
F ₀ /F _m	0,183±0,007 ^a	0,217±0,006 ^b	0,159±0,007 ^c
F _v /F _m	0,817±0,007 ^a	0,783±0,006 ^b	0,841±0,007 ^c
F _v /F ₀	4,545±0,133 ^a	4,014±0,114 ^b	5,333±0,139 ^c
F dinámicos			
V _j	0,647±0,016 ^{ab}	0,674±0,014 ^b	0,570±0,017 ^c
V _i	0,933±0,004 ^a	0,937±0,004 ^a	0,895±0,005 ^b
(d _{vG} /d _t) ₀	1,039±0,043 ^a	1,132±0,036 ^a	0,872±0,043 ^b
(d _v /d _t) ₀	1,508±0,041 ^a	1,579±0,034 ^a	1,326±0,041 ^b
Áreas			
S _m	10,505±0,531 ^{ab}	9,384±0,449 ^a	13,179±0,538 ^c
S _m /t _{Fmax}	0,032±0,002 ^a	0,032±0,002 ^a	0,048±0,002 ^b
N	24,470±1,278 ^a	21,926±1,080 ^a	30,630±1,295 ^b
Flujos por CR			
ABS/RC	2,847±0,040 ^{ab}	2,979±0,034 ^b	2,776±0,040 ^a
DI ₀ /RC	0,520±0,03 ^{ab}	0,648±0,025 ^c	0,462±0,029 ^a
TR ₀ /RC	2,327±0,023 ^a	2,331±0,019 ^a	2,314±0,022 ^a
ET ₀ /RC	0,840±0,037 ^{ab}	0,8±0,032 ^a	0,997±0,037 ^c
RE ₀ /RC	0,163±0,01 ^a	0,156±0,009 ^a	0,244±0,01 ^b
Rendimientos			
φ _{P0}	0,818±0,007 ^{ab}	0,784±0,006 ^c	0,840±0,007 ^b
Ψ ₀	0,362±0,016 ^a	0,341±0,013 ^a	0,433±0,016 ^c
φ _{E0}	0,297±0,014 ^{ab}	0,275±0,012 ^a	0,364±0,014 ^c
Δ _{R0}	0,188±0,009 ^a	0,187±0,007 ^a	0,243±0,009 ^b
φ _{R0}	0,058±0,004 ^{ab}	0,053±0,003 ^a	0,089±0,004 ^c
Densidad de CRs			
RC/CS ₀	106,076±0,0382 ^a	118,6059±0,02530 ^b	95,5947±0,04948 ^c
RC/CS _m	580,482±0,0038 ^a	550,8173±0,00337 ^b	601,8937±0,00377 ^c
Actividades			
ABS/CS ₀	297,694±11,601 ^{ab}	348,077±9,652 ^c	274,842±11,291 ^a
DI ₀ /CS ₀	54,195±5,378 ^a	80,094±4,475 ^b	45,922±5,234 ^a
TR ₀ /CS ₀	243,499±6,760 ^{ab}	267,982±5,625 ^c	228,921±6,580 ^a
ET ₀ /CS ₀	88,279±3,895 ^a	88,075±3,241 ^a	95,789±3,791 ^{ab}
RE ₀ /CS ₀	16,925±1,075 ^a	17,050±0,894 ^a	23,808±1,046 ^b
ABS/CS _m	1652,632±28,649 ^a	1628,167±24,033 ^a	1668±28,279 ^a
DI ₀ /CS _m	302±13,043 ^{ab}	367,333±10,941 ^c	278,385±12,874 ^a
TR ₀ /CS _m	1350,632±29,594 ^{ab}	1260,833±24,826 ^a	1389,615±29,212 ^b
ET ₀ /CS _m	498,632±25,76 ^{ab}	431,185±21,609 ^a	587,872±25,428 ^c
RE ₀ /CS _m	101,5±6,986 ^{ab}	83,093±5,86 ^a	145,538±6,896 ^c

Anexo 2: Parámetros del test JIP y sus valores calculados para Col-0 y los mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk* en condiciones control. Los valores representan la media ± error estándar de al menos 15 réplicas. El análisis de la varianza entre plantas se hizo utilizando el test Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas respecto Col-0 se marcaron con diferente letra a un nivel p<0,05.

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tratamiento MV		
	Col-0	<i>atprx52Salk</i>	<i>atprx72Salk</i>
F extremos			
F ₀	375.179±21.225 ^{ab}	433.735±22.732 ^b	367.848±23.074 ^{ab}
F _m	1539.846±49.969 ^a	1164.059±53.518 ^b	1475.939±54.323 ^a
F _v	1164.667±48.430 ^a	730.324±51.869 ^b	1108.091±52.649 ^a
F ₀ /F _m	0.255±0.021 ^a	0.426±0.022 ^b	0.251±0.023 ^a
F _v /F _m	0.745±0.021 ^a	0.574±0.022 ^b	0.749±0.023 ^a
F _v /F ₀	3.203±0.171 ^a	2.107±0.183 ^b	3.055±0.186 ^a
F dinámicos			
V _j	0.553±0.023 ^a	0.634±0.025 ^c	0.446±0.024 ^b
V _i	0.896±0.025 ^a	0.902±0.028 ^a	0.766±0.027 ^b
(d _{vG} /d _t) ₀	0.955±0.109 ^a	1.193±0.119 ^a	0.910±0.117 ^a
(d _v /d _t) ₀	1.327±0.039 ^a	1.562±0.043 ^b	1.249±0.031 ^a
Áreas			
S _m	16.984±5.348 ^a	21.416±5.828 ^{ab}	60.503±5.739 ^c
S _m /t _{Fmax}	0.03±0.005 ^a	0.028±0.006 ^a	0.041±0.006 ^a
N	41.249±17.235 ^a	57.259±18.781 ^{ab}	179.179±18.495 ^c
Flujos por CR			
ABS/RC	3.227±0.713 ^a	6.775±0.77 ^b	3.725±0.765 ^a
DI ₀ /RC	0.828±0.717 ^a	4.283±0.781 ^b	0.957±0.769 ^a
TR ₀ /RC	2.399±0.053 ^a	2.492±0.058 ^a	2.768±0.057 ^b
ET ₀ /RC	1.072±0.052 ^{ab}	0.930±0.057 ^a	1.546±0.056 ^c
RE ₀ /RC	0.253±0.045 ^a	0.255±0.049 ^a	0.673±0.049 ^b
Rendimientos			
φ _{P0}	0.745±0.02 ^a	0.592±0.022 ^b	0.749±0.022 ^a
Ψ ₀	0.461±0.025 ^{ab}	0.385±0.027 ^a	0.554±0.027 ^c
φ _{E0}	0.34±0.015 ^a	0.233±0.017 ^b	0.414±0.017 ^c
Δ _{R0}	0.249±0.047 ^{ab}	0.146±0.051 ^a	0.410±0.051 ^b
φ _{R0}	0.089±0.018 ^{ab}	0.066±0.019 ^a	0.172±0.019 ^c
Densidad de CRs			
RC/CS ₀	116,2624±0,19617 ^a	64,0199±0,195494 ^b	106,8048±0,217450 ^a
RC/CS _m	477,1757±0,0468 ^a	171,8168±0,071355 ^b	396,2252±0,0526572 ^a
Actividades			
ABS/CS ₀	375.179±21.225 ^{ab}	433.735±22.732 ^b	367.848±23.074 ^{ab}
DI ₀ /CS ₀	97.946±17.799 ^a	219.862±19.063 ^b	93.316±19.35 ^a
TR ₀ /CS ₀	277.233±10.075 ^a	213.873±10.791 ^b	274.533±10.953 ^a
ET ₀ /CS ₀	123.531±5.227 ^a	80.43±5.598 ^b	151.325±5.682 ^c
RE ₀ /CS ₀	29.259±3.756 ^a	22.774±4.022 ^a	63.507±4.083 ^b
ABS/CS _m	1539.846±49.969 ^a	1164.059±53.518 ^b	1475.939±54.323 ^a
DI ₀ /CS _m	375.179±21.225 ^{ab}	433.735±22.732 ^b	367.848±23.074 ^{ab}
TR ₀ /CS _m	1164.667±48.430 ^a	730.324±51.869 ^b	1108.091±52.649 ^a
ET ₀ /CS _m	518.795±25.063 ^{ab}	292.471±26.842 ^c	606.424±27.246 ^b
RE ₀ /CS _m	119.179±12.978 ^{ab}	83.353±13.9 ^b	246.242±14.109 ^c

Anexo 3: Parámetros del test JIP y sus valores calculados para Col-0 y los mutantes *atprx52Salk* y *atprx72Salk* bajo estrés por MV. Los valores representan la media ± error estándar de al menos 15 réplicas. El análisis de la varianza entre plantas se hizo utilizando el test Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas respecto Col-0 se marcaron con diferente letra a un nivel p<0,05.

