



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
OLIGOSACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR DE  
MAÍZ: EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD  
INMUNOESTIMULANTE**

---

**OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF  
OLIGOSACCHARIDES FROM MAIZE CELL WALL:  
EVALUATION OF ITS IMMUNOSTIMULATORY  
CAPACITY**

**Autor: Estela Crespo Sierra**

Tutores: Antonio E. Encina García y Hugo Mélida Martínez

**GRADO EN BIOLOGÍA**

**Julio, 2023**

## ÍNDICE

Introducción.....	1
1. Características biológicas, de cultivo e importancia del maíz.....	1
2. Factores que reducen la producción del cultivo de maíz.....	2
3. Sistemas de defensa de las plantas.....	3
4. Hipótesis y Objetivos.....	7
Materiales y métodos.....	8
1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	8
2. Obtención del residuo insoluble en Alcohol – AIR.....	9
3. Obtención de la fracción hemicelulósica a partir de AIR.....	10
4. Tratamiento enzimático del AIR y fracción hemicelulósica: obtención de fracciones oligosacarídicas.....	11
5. Análisis de la composición en azúcares de los productos de digestión enzimática.....	12
6. Experimentos para la inducción de ROS.....	13
Resultados.....	15
1. Caracterización de los productos de digestión enzimática obtenidos a partir del AIR y de la fracción hemicelulósica de pared celular.....	15
2. Inducción de ROS en discos foliares de maíz tras el tratamiento con fracciones oligosacarídicas de pared celular de maíz B73.....	17
3. Inducción de ROS en plántulas de <i>A. thaliana</i> tras el tratamiento con fracciones oligosacarídicas de pared celular de maíz.....	19
Discusión.....	20
Referencias.....	24

## RESUMEN

La pared celular de las plantas juega un papel crucial en su defensa contra el ataque de patógenos. Actúa como barrera física y como barrera química activando los mecanismos de defensa inmune de plantas, como la PTI. Los objetivos del trabajo se basaron en la obtención y caracterización de oligosacáridos a partir de la pared celular de maíz, y en la evaluación de la capacidad inmunoestimulante de los mismos. Para ello, se generaron muestras de pared celular de maíz (AIR) o de fracciones hemicelulósicas (fr. KOH) tratadas enzimáticamente con Driselasa y endoxilanas GH11. El análisis de la composición de dichas fracciones indicó que estaban compuestas mayoritariamente por oligosacáridos de Arabinosa, Xilosa y Galactosa.

Por otra parte, mediante la cuantificación de  $H_2O_2$ , por el método del luminol-peroxidasa, se intentó determinar si alguno de los compuestos obtenidos actuaba como DAMP e iniciaba la respuesta defensiva. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron respuesta de ningún tipo. Es muy posible que se deba a que los oligosacáridos obtenidos de las digestiones enzimáticas eran de tal tamaño que les impedía actuar como DAMPs. Como propuesta de futuro sugeriría repetir el procedimiento experimental con otro tipo de enzimas para intentar caracterizar las moléculas que sí estimulan la PTI ya que, mediante la aplicación externa de moléculas DAMP se podría mejorar la resistencia de los cultivos.

**Palabras clave:** enzima, especies reactivas de oxígeno (ROS), fracción insoluble en alcohol (AIR), inmunidad desencadenada por patrones (PTI), pared celular, *Zea mays* L.

## ABSTRACT

The plant cell wall plays a crucial role in its defence against pathogen attacks. It acts as a physical and chemical barrier, activating the immune defence mechanism of the plant, such as the PTI. The present research aimed to obtain and characterize oligosaccharides from maize cell wall and to evaluate their immunostimulant capacity. To achieve so, several maize cell wall (AIR) or hemicellulosic fractions (fr. KOH) samples were generated and enzymatically treated using Driselase and endoxylanase GH11. The analysis of the composition of these fractions indicated that they were mainly composed of oligosaccharides of Arabinose, Xylose, and Galactose.

Moreover, quantifying  $H_2O_2$  through the luminol-peroxidase method aimed at determining whether any of the obtained components acted as DAMP and initiated a defensive response. However, the outcome did not show any response. The oligosaccharides obtained from the enzymatic digestion were of such size that they could not act as DAMPs. The same experimental procedure could be repeated using a different kind of enzyme to try and characterize the molecules that indeed stimulate the PTI since, through the external application of DAMP molecules, the resistance of crops could be increased.

**Key words:** alcohol insoluble fraction (AIR), cell wall, enzyme, pattern-triggered immunity (PTI), reactive oxygen species (ROS), *Zea mays* L.

## **ABREVIATURAS**

AIR – Fracción Insoluble en Alcohol “Alcohol Insoluble Fraction”

AX – Arabinoxilano

DAMPs – Patrones Moleculares Asociados a Daños “Damage-Associated Molecular Patterns”

Fr. KOH – Fracción KOH procedente de AIR.

GAX – Glucuronoarabinoxilano

MLG – Glucano Mixto “Mixed Linked Glucan”

PAMPs – Patrones Moleculares Asociados a Patógenos “Patogen-Associated Molecular Patterns”

PRR – Receptores de Reconocimiento de Patrones “Pattern Recognizing Receptor”

PTI – Inmunidad Activada por Patrón “Pattern Triggered Immunity”

ROS – Especies Reactivas de Oxígeno

TLC – Cromatografía en Capa Fina “Thin Layer Chromatography”

## INTRODUCCIÓN

### 1. Características biológicas, de cultivo e importancia del maíz

El maíz –*Zea mays* L.– es una gramínea de la familia Poaceae. Es la única especie cultivada de su género y es originaria de América. Se trata de una planta C4 que presenta una alta tasa de actividad fotosintética. Sus tallos son largos y macizos, pueden alcanzar hasta los 4 metros de altura, y sus hojas son estrechas y lanceoladas (Paliwal, 2001).

Las flores masculinas se encuentran a los lados de una gran espiga central, y se encargan de la formación del polen. Por debajo de estas, en la axila de las hojas, se pueden formar yemas laterales que terminan en inflorescencias femeninas o mazorcas. Se encuentran recubiertas por hojas, y su función principal es la reserva de sustancias nutritivas. Ambos sexos se encuentran en el mismo pie de planta o individuo (Paliwal, 2001).

El fruto en cariósipide del maíz se caracteriza por poseer un alto valor nutricional y por eso es un alimento de gran importancia económica. Se utiliza en la industria alimenticia, para consumo humano y para la alimentación animal. Cabe destacar su alto aporte energético, vitamínico, de hidratos de carbono, Ca, P o K (Paliwal, 2001). Además, es el único cereal que se utiliza, mediante el ensilado de los tallos y hojas, para la producción industrial de forraje en la alimentación del ganado, por eso su cultivo ha aumentado considerablemente desde inicios de este siglo (Quesada-Ocampo *et al.*, 2016).

Por otro lado, el maíz es fuente de un gran número de productos industriales. Las fibras del maíz se pueden utilizar para crear diferentes productos textiles. Los restos de desecho se utilizan para la fabricación de compost, y los estilos y estigmas de las flores (sedas del maíz o pelos del elote) tienen propiedades medicinales que sirven para el tratamiento de patologías renales, circulatorias o digestivas (Gamboa, 1999). También se puede utilizar para la fabricación de polímeros comestibles, juntando la zeína (proteína) con algún plastificante. Esta aplicación es de especial interés ya que ayuda a alargar la vida útil de los alimentos de forma segura (Montalvo *et al.*, 2012).

El maíz es el segundo cultivo más importante y productivo, después del trigo. La producción mundial de este cultivo en 2021 alcanzó los 1.187 millones de toneladas y en España 4.597.660 toneladas, convirtiendo al país en el cuarto mayor productor de la Unión Europea (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021). Los principales productores de maíz a nivel mundial son Estados Unidos (produciendo más del 35%), China (representa el 22%),

Brasil y Argentina, seguidos por México, Ucrania y la Unión Europea (FAO 2022). En este sentido, la selección artificial y el cruce selectivo para la creación de híbridos, es esencial para conseguir variedades más resistentes, tolerantes a condiciones ambientales adversas o mejorar la calidad del grano. Esta especie de cultivo responde muy bien a la heterosis, puesto que la descendencia híbrida presenta caracteres especialmente beneficiosos para el hombre (Berlan, 2018).

## **2. Factores que reducen la producción del cultivo de maíz**

El maíz es un cultivo muy productivo pero esta productividad depende de la presencia de altas temperaturas durante el periodo de crecimiento vegetativo, de una alta disponibilidad de agua y del control de enfermedades microbianas y de plagas de insectos como el taladro del maíz.

Las enfermedades más comunes afectan a las hojas, pudiendo producir tizones, manchas o royas. Otras enfermedades afectan a las raíces, al tallo o la inflorescencia provocando las enfermedades denominadas genéricamente como pudrición de la raíz, del tallo o de la mazorca, respectivamente. Estas pudriciones están comúnmente causada por los hongos de los géneros *Fusarium* y *Colletotrichum* (Paliwal, 2001; Savary *et al.*, 2017). Las principales vías de infección son a través del canal de la seda (estilos de las flores), o por lesiones en órganos vegetativos causadas por insectos. Las plantas afectadas por hongos que causan pudriciones presentan una decoloración blanca o rojiza con síntomas de pudrición en las mazorcas y dentro del tallo o las raíces. Los hongos del género *Fusarium* (p. ej. *F. graminearum* o *F. verticilloides*) son especialmente relevantes, pues pueden colonizar el maíz en cualquier etapa de su ciclo vital, siendo éste altamente vulnerable a la degradación por micotoxinas secretadas por el hongo, como las fumonisinas, nivalenol, deoxinivalenol o zearalenón (Pfordt *et al.*, 2020). Además, el daño causado por estos hongos puede no ser perceptible a simple vista (Elos *et al.*, 2005) reduciendo el rendimiento y la calidad del cultivo de maíz.

Hay estudios que confirman que una temperatura moderada y un alto nivel de humedad, además de aumentar el crecimiento de la planta, también puede aumentar las tasas de infección por agentes microbianos. Estas enfermedades comprometen la seguridad alimentaria y se asocian a hambrunas, ya que producen la pérdida de gran cantidad de cultivos y la incapacidad para abastecer a toda la población (Stukenbrock y Gurr, 2023). Como métodos de prevención frente a estas enfermedades, además de métodos clásicos como la rotación de cultivos, el arado y el control de las heridas producido por los insectos, se están tratando de

desarrollar nuevos métodos de control biológico y de bioestimulación, como el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (De La Vega-Camarillo *et al.*, 2023), o la utilización de microorganismos capaces de controlar el desarrollo de enfermedades (Mondino y Vero, 2006; Pfordt *et al.*, 2020). Además, hay que tener en cuenta que los híbridos cultivados actualmente son más productivos, pero a menudo resultan menos resistentes a enfermedades que las variedades silvestres (Quesada-Ocampo *et al.*, 2016). Por tanto, además de las estrategias ya mencionadas, también se busca la mejora genética del maíz para aumentar la resistencia del huésped a la entrada de estos patógenos. Sin embargo, esta estrategia se ve limitada por la gran variedad especies que pueden afectar al cultivo (Pfordt *et al.*, 2020).

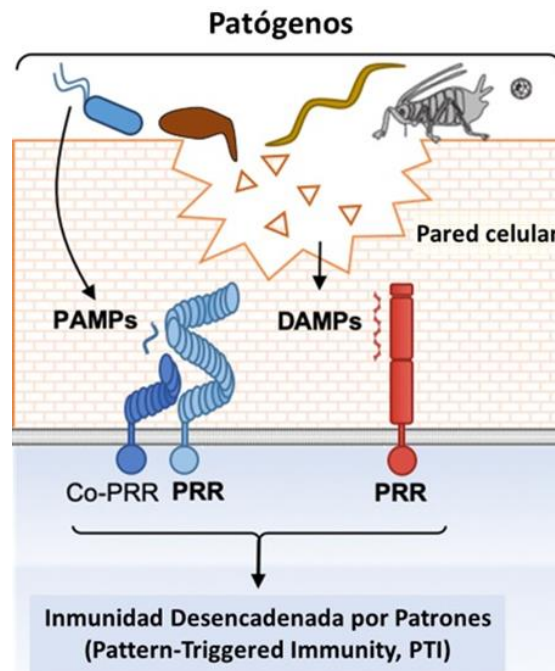
Si bien las plantas se ven afectadas por múltiples patógenos, poseen sistemas de defensa naturales que generalmente les permiten responder y actuar exitosamente frente a ataques de patógenos que podrían causar enfermedades, como se detalla en el siguiente apartado.

### 3. Sistemas de defensa de las plantas

Cuando las plantas sufren ataques por patógenos, lo más probable es que disminuyan su rendimiento para hacer frente al estrés biótico asociado al ataque (Lovell *et al.*, 2021). Como consecuencia de la interacción con su patógeno, la planta inicia una respuesta defensiva o inmunitaria gracias a la integración de diferentes señales. En primer lugar, se desencadena la **inmunidad inducida por patrones (PTI)**, basada en el reconocimiento de **patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)** o de **patrones moleculares asociados a daños (DAMPs)** por parte de los **receptores de reconocimiento de patrones (PRR)** de las células vegetales (**Figura 1**; Jones y Dangl, 2006). Las moléculas tipo DAMP corresponden a fragmentos de estructuras celulares del huésped resultantes del daño originado por el patógeno o bien sintetizadas directamente por el huésped para amplificar su respuesta defensiva (Rebaque, 2021).

Tras el reconocimiento de los PAMPs o DAMPs, se activan varias cascadas de señalización celular (Boutrot y Zipfel, 2017). De hecho, habitualmente la activación de esta PTI es suficiente para repeler el ataque de patógenos. Uno de los principales resultados de la activación de la PTI es la producción, por parte de las plantas, de especies reactivas de oxígeno (ROS), mayoritariamente en forma de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Wrzaczek *et al.*, 2013), pero también como O<sub>2</sub><sup>-</sup>, <sup>•</sup>HO o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Hasanuzzaman *et al.*, 2020), además de

elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, fosforilaciones de proteínas quinasas o reprogramación transcripcional de genes.



**Figura 1. Esquema general de las capas iniciales de percepción de estímulos y defensa de las plantas.** La pared de las células de las plantas se considera una importante capa de defensa en la interacción planta-patógeno, tanto como escudo físico como regulador biológico de las respuestas defensivas. La siguiente capa de la inmunidad vegetal se basa en la percepción por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (“pattern recognition receptors”; PRRs), tanto de patrones moleculares asociados a patógenos (“pathogen-associated molecular patterns”; PAMPs) como de patrones moleculares asociados a daño (“damage-associated molecular patterns”; DAMPs), que desencadenan una cascada de respuestas conocida como inmunidad desencadenada por patrones (“pattern-triggered immunity”; PTI) que podría ser suficiente para proteger la célula vegetal.

Un componente esencial para la activación de la PTI como estrategia defensiva frente a patógenos es la **pared celular** de las plantas. Se trata de una estructura dinámica y compleja que rodea el protoplasto de las células vegetales y que normalmente se divide en pared celular primaria y secundaria (Bacete *et al.*, 2018). Los elementos principales de las paredes celulares de las plantas son la celulosa, la lignina, las hemicelulosas, las pectinas y proteínas enzimáticas y estructurales (Carpita *et al.*, 2015). La **celulosa** constituye hasta el 50% del peso seco de la pared celular secundaria (Carpita *et al.*, 2015). Es el polímero estructural principal, y gracias a sus propiedades mecánicas, determina la resistencia de los tejidos vegetales (Shtein *et al.*, 2018). Está formada por 18 cadenas paralelas de  $\beta$ -1,4-glucano organizadas en microfibrillas cristalinas, aunque en ocasiones, se encuentran regiones amorfas que pueden interactuar con los polisacáridos de la matriz (Somerville, 2006; Zhong *et al.*, 2019). Por su parte, la **lignina** es un heteropolímero fenólico complejo que está compuesto



por monómeros de *p*-hidroxifenilo, guayuaçilo y siringilo junto ay otros fenoles en menor cantidad (Boerjan *et al.*, 2003; Fornalé *et al.*, 2017). Las **hemicelulosas** son polisacáridos formados por una estructura lineal de xilosa, glucosa o manosa con ramificaciones cortas de arabinosa, xilosa, galactosa, fructosa o ácido glucurónico (Pauly *et al.*, 2013). Los xilanos son el principal componente hemiceluloso de la pared celular secundaria. En gramíneas se sustituyen por arabinosa o ácido glucurónico, lo que permite distinguir arabinoxilanos (AX) de glurunoarabinoxilanos (GAX) (**Figura 2**) (Scheller y Ulvskov, 2010). Estos xilanos también pueden presentar residuos fenólicos (ác. ferúlico y *p*-cumárico principalmente) esterificados en los residuos de arabinosa de los AX (Kato y Nevins, 1985). Además, las gramíneas suelen contener glucano mixto (MLG) (**Figura 2**) en sus paredes celulares. Se trata de otra hemicelulosa compuesta por un esqueleto lineal de glucosa unido por enlaces  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,4 (Burton *et al.*, 2009). Este compuesto es capaz de inducir características de PTI convirtiendo a los oligosacáridos de glucano mixto en un grupo de patrones moleculares (Rebaque, 2021).

	Cadena central	Sustituciones (más frecuentes)
Arabinoxilano	(1→4)- $\beta$ -D- Xil	$\alpha$ -D-Ara (1→3) / $\alpha$ -D-Ara (1→2)
(Glucurono)arabinoxilano	(1→4)- $\beta$ -D- Xil	(4-O-metil)- $\alpha$ -D-GlcU (1→2)
Glucano mixto	(1→3),(1→4)- $\beta$ -D- Glc	

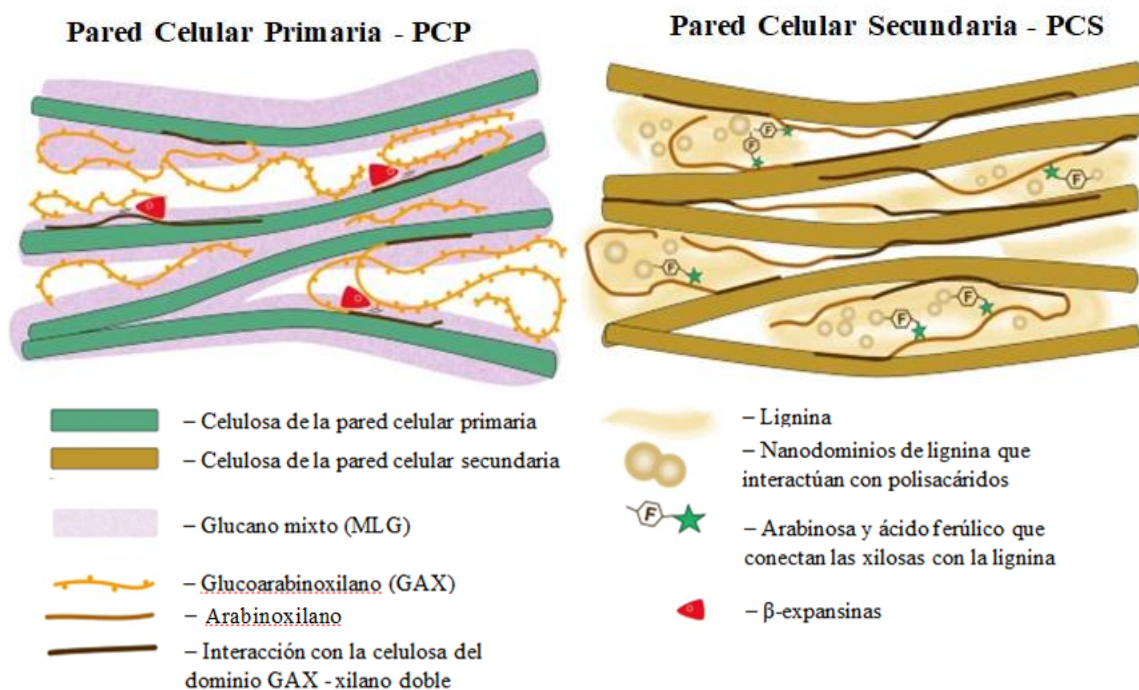
**Figura 2** Resumen de las estructuras moleculares, sustituciones y los tipos de enlace más frecuentes de las principales hemicelulosas de la pared celular de maíz. Abreviaturas: Xil, xilosa; Glc, glucosa; Gal, galactosa; GlcU, ácido glucurónico. (Largo, 2016)

Las **pectinas** son polisacáridos de ácido galacturónico estructuralmente complejos (Wan *et al.*, 2021). que controlan el crecimiento participando en la adhesión celular, la porosidad y la carga de las paredes celulares, la retención de agua y la defensa celular (Wolf y Greiner., 2012). Entre las **proteínas** destacan aquellas que regulan, entre otros, el proceso de expansión celular o la respuesta a patógenos, a través de la modificación de la estructura de los polisacáridos y/o las interacciones entre los diferentes componentes estructurales. Entre esas proteínas cabe destacar la presencia de expansinas, xiloglucano-endotransglucosidasas y otras endo y exoglucanasas (Kozlova *et al.*, 2020).

La pared celular primaria de maíz se compone de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de AX y GAX, que son las hemicelulosas principales en esta especie (**Figura 3**). Tal como se indicó, unidos a esta cadena de AX o GAX aparecen residuos fenólicos como ácidos

ferúlicos, *p*-cumárico, diferulatos y tricina. En las paredes celulares de las gramíneas, además de la matriz formada por AX/GAX aparecen pequeñas cantidades de pectinas (homogalacturonano y rhamnogalacturonano I), un componente escaso pero esencial en paredes celulares de gramíneas (Kozlova *et al.*, 2020).

En muchos tipos celulares de plantas, su diferenciación y especialización funcional se acompaña de la producción y acumulación de una pared celular secundaria (**Figura 3**) entre la membrana plasmática y la pared celular preexistente. Esta nueva estructura se caracteriza por la acumulación de gran cantidad de celulosa entrelazada con AX y GAX y por la deposición de lignina, un componente que determina cambios en las características físicas y químicas de la pared celular (Kozlova *et al.*, 2020).



**Figura 3.** Representación esquemática de los polímeros de la pared celular primaria (PCP) y secundaria (PCS) de tipo II, típico de gramíneas y cereales grupo al que pertenece el maíz (Modificación de Kozlova *et al.*, 2020).

Los enlaces entre los diferentes componentes de la pared celular determinan, en último término, la estructura de la pared celular y están involucrados en el correcto funcionamiento de la célula de la planta, por eso cambios en la estructura de la pared celular o de sus componentes provocan la activación de los sistemas defensivos (Barros *et al.*, 2011; Kozlova *et al.*, 2020).

#### 4. Hipótesis y Objetivos

Actualmente, es posible mejorar la resistencia de las plantas a enfermedades mediante la inducción artificial de dicha PTI, mediante la aplicación externa de moléculas DAMP (Rebaque, 2021).

Este trabajo de investigación forma parte de una línea más amplia en la que se estudian las bases moleculares de la inmunidad inducida por patrones moleculares en maíz con el propósito final de mejorar la resistencia natural de este cultivo a través de la activación temprana maíz de sus sistemas de defensa inmunitaria por la detección de estructuras de su propia pared celular que actúan como DAMPs.

En estudios previos se determinó que algunas dicotiledóneas perciben como DAMPs las decoraciones de arabinosa de cadenas de  $\beta$ -1,4-xilooligosacáridos de grados específicos de polimerización (Mélida *et al.*, 2020). Por tanto, la hipótesis de partida consistió en que dado que AX y GAX son mucho más abundantes en monocotiledóneas, como el maíz, que en dicotiledóneas, estas estructuras también podrían actuar como DAMPs en maíz.

Para comprobar dicha hipótesis, se establecieron los siguientes objetivos:

- (1) Obtención y caracterización de oligosacáridos a partir de la pared celular de maíz.
- (2) Evaluación de la capacidad inmunoestimulante de los oligosacáridos generados sobre maíz y *Arabidopsis thaliana* como especie modelo en plantas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal y condiciones de cultivo

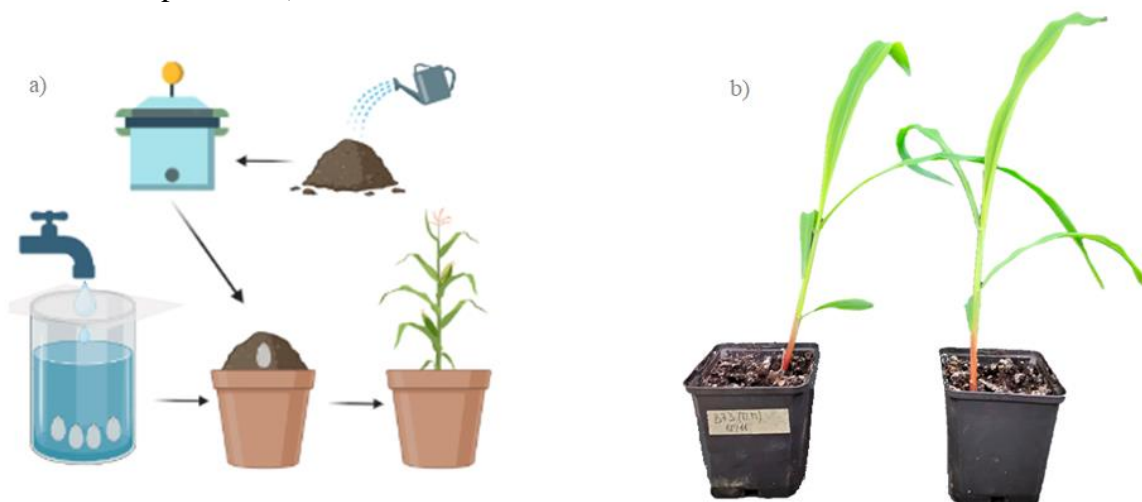
Para los experimentos de elicitación se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col0), y plantas de maíz de la línea pura B73 cuyas semillas fueron donadas amablemente por el Dr. S. Carabelos (Misión Biológica de Galicia -MBG-CSIC-).

Para la obtención de oligosacáridos de la pared celular se utilizaron cultivos celulares de maíz (callos celulares) obtenidos a partir de embriones inmaduros de maíz var. Black Mexican y mantenidos en el área de Fisiología Vegetal en condiciones estándar de cultivo *in-vitro* para este material (Mélida *et al.*, 2009).

#### Cultivo de maíz B73

Se tomaron semillas de maíz B73 y se embebieron en agua durante aproximadamente 12 h bajo un flujo constante de agua. Se utilizó sustrato universal para cultivo de plantas (COMPO) que se mezcló con agua en una proporción 2:1 (p:v) y se esterilizó (121°C, 1 atm, 30 min).

Se sembraron 3 semillas por maceta (250 ml) rellenas con el sustrato estéril descrito. Tras la germinación de las semillas, las plantas de maíz se cultivaron durante 10 días en condiciones controladas a 20-25°C, con un fotoperiodo de 16:8 y una densidad de flujo fotónico de 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  (**Figura 4**). Tal como se ha indicado, las plantas así cultivadas se utilizaron posteriormente para la evaluación de la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre discos foliares (ver apartado correspondiente).



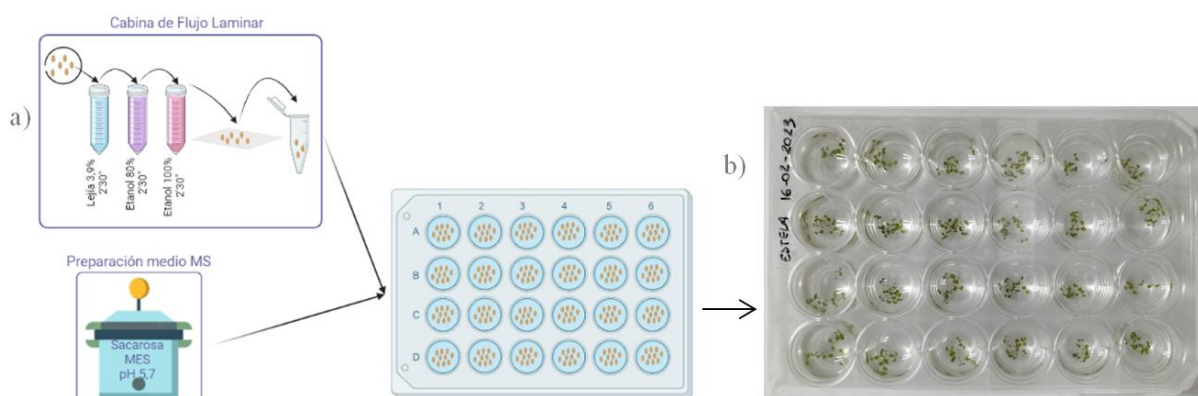
**Figura 4.** (a) Representación gráfica de los pasos a seguir para el cultivo de maíz. (b) Fotografía representativa del estadio de crecimiento de la planta en el momento de su utilización para los experimentos de producción de ROS. (Gráfico de elaboración propia en base a imágenes tomadas de BioRender).

## Esterilización de semillas y cultivo de *A. thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* se esterilizaron bajo cabina de flujo laminar mediante inmersión en lejía comercial al 3,9% durante 2,5 min. Luego se pasaron a una solución de etanol al 80% (2,5 min), y por último, a una solución de etanol al 100% (2,5 min). Para finalizar, se secaron sobre papel de filtro estéril y se guardaron en un tubo eppendorf estéril hasta su utilización.

Las semillas se germinaron sobre medio líquido MS (2,15 g/l) adicionado con sacarosa (2,5 g/l) y MES (195,2 mg /l), pH 5,7, autoclavado (121°C, 1 atm, durante 30 min). El medio líquido se añadió a los pocillos de una placa de 24 (Corning Costar 24). En cada pocillo se colocaron 10 semillas y se cultivaron durante 7 días, a 25°C, fotoperiodo de 16:8, bajo condiciones de luz tenue (**Figura 5**).

Las plántulas cultivadas se utilizaron posteriormente para la evaluación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ver apartado correspondiente).



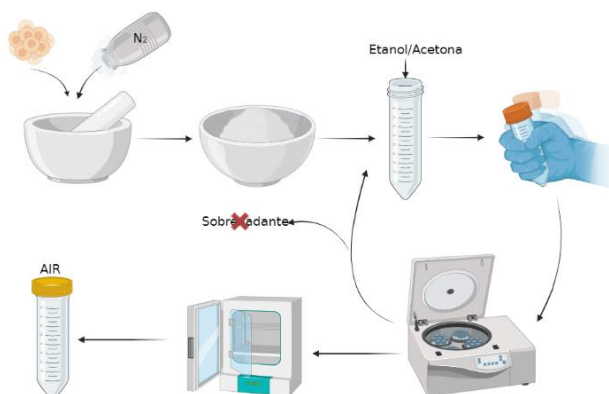
**Figura 5.** (a) Representación gráfica de los pasos a seguir para la esterilización y cultivo de semillas de *A. thaliana*. (b) Fotografía que muestra el crecimiento de las plántulas de *A. thaliana* a la hora de su utilización para la medición de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Gráfico de elaboración propia en base a imágenes tomadas de BioRender).

## **2. Obtención del residuo insoluble en alcohol – AIR; alcohol insoluble residue -**

Mediante este procedimiento se obtuvo a partir de células de maíz cultivadas “in-vitro” un material enriquecido en paredes celulares. Para ello, se recogieron células procedentes de cultivos celulares de maíz en fase estacionaria y se añadieron a un mortero a baja temperatura (-20°C). Posteriormente se pulverizaron con nitrógeno líquido y el material resultante se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml (**Figura 6**).

El pulverizado se incubó en etanol al 70% (0,1g/40 ml) durante 72 h, en agitación constante (100 rpm). Transcurrido ese tiempo, la suspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Este lavado se realizó dos veces consecutivas. El precipitado se volvió a suspender en etanol al 96% (0,1g/40ml). Se centrifugó en las condiciones descritas y se eliminó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces.

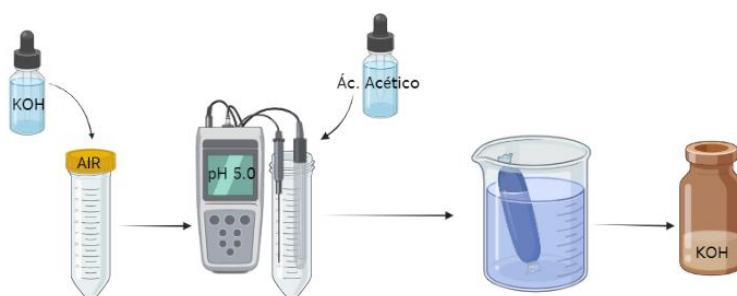
A continuación, el nuevo precipitado se suspendió en acetona pura, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante de la misma forma que en los pasos anteriores. También se realizaron dos lavados con acetona. Por último, el precipitado se dejó secar en una estufa a 45°C, y se conservó en seco hasta su utilización.



**Figura 6.** Representación gráfica de los pasos a seguir para la obtención de AIR a partir de células de maíz. (Gráfico de elaboración propia en base a imágenes tomadas de BioRender).

### 3. Obtención de la fracción hemicelulósica a partir de AIR de maíz

Para su obtención, se suspendieron 10 mg de AIR en 100 mL de KOH 1M y se incubó durante 24 h (**Figura 7**). Transcurrido ese tiempo, la suspensión se acidificó con ácido acético concentrado, hasta un pH de 5,0. A continuación, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante. Este se introdujo en una membrana de diálisis de 1KDa de tamaño de poro (Spectra/POR, EEUU) y se dializó frente a agua destilada durante 24 h (el agua se renovó cada 6-8 horas). La fracción dializada (fr. KOH) se congeló a -20°C y se liofilizó para su conservación a temperatura ambiente.



**Figura 7.** Representación gráfica de los pasos a seguir para la obtención de la fracción hemicelulósica (KOH) mediante tratamiento con KOH a partir de AIR procedente de células de maíz. (Gráfico de elaboración propia en base a imágenes tomadas de BioRender).

#### **4. Tratamiento enzimático del AIR y fracción hemicelulósica: obtención de fracciones oligosacarídicas**

##### Digestión con Driselasa

Tanto el AIR como la fracción hemicelulósica (fr. KOH), fueron sometidas a una digestión enzimática con Driselasa. En dos tubos de 15 ml se añadieron 100 mg de AIR, respectivamente. Sobre estos se añadieron 5 ml de una disolución de Driselasa (286-005-3; Sigma co., EEUU) al 0,1% (p:v) en tampón acetato sódico 20 mM, pH 4,8 + azida Na 0,005%, e inmediatamente sobre uno de ellos, 900 µl de ácido fórmico (concentrado) para parar la reacción y que actuara como control negativo para la digestión enzimática (control de digestión enzimática a t<sub>0</sub>).

Por otra parte, en dos tubos eppendorf se añadieron 25 mg de fr. KOH, respectivamente; y sobre ellos 1,25 ml de la disolución enzimática de Driselasa tal como se describe en el párrafo anterior. De forma análoga, se paró la reacción a tiempo 0 en uno de los tubos añadiendo 220 µl de ácido fórmico.

Las cuatro muestras se incubaron en agitación constante en una estufa a 37° C durante 72 horas. Transcurrido ese tiempo, se paró la reacción de las muestras pertinentes mediante acidificación con ácido fórmico concentrado igual que se hizo con sus respectivos controles.

##### Digestión con Endoxilanasas GH11

La endoxilanasas GH11 (Ec. 3.2.1.8; Megazyme co., Irlanda) es una enzima muy específica que corta entre residuos de xilosas de cadenas de xilanos. De forma análoga al procedimiento anterior se pesaron 100 mg y 25 mg de AIR y fr. KOH, respectivamente. Sobre los 100 mg de AIR se añadieron 4,9 ml de agua y 100 µl de tampón fosfato-sódico 0,5 M (pH 6,0) ambos precalentados a 40°C. Después, se adicionó la enzima (1,95 µl de GH11). Para los 25 mg de fr. KOH se añadieron 1,23 ml de agua, 25 µl de tampón fosfato-sódico (pH 6,0) y 1 µl de endoxilanasas GH11.

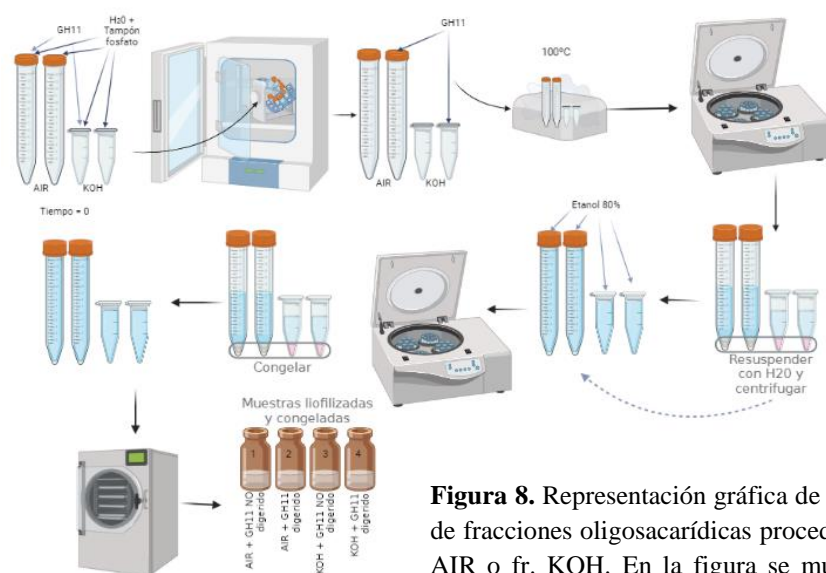
Los tratamientos enzimáticos se incubaron a 40°C durante 4 horas en agitación constante y posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. Se recogieron los sobrenadantes, y los precipitados resultantes se re-suspendieron en 1 ml de agua destilada para centrifugarlos de nuevo en las condiciones descritas anteriormente. El sobrenadante



obtenido se mezcló con el anterior para constituir la fracción digerida con endoxilanas GH11.

### Obtención de fracciones oligosacáridicas

Las fracciones digeridas con Driselasa y endoxilanas GH11 se mezclaron con alcohol absoluto hasta alcanzar una concentración del 80% y se mantuvieron durante 12h a  $-20^{\circ}\text{C}$  (**Figura 8**). De esta manera se consigue la separación del componente oligosacáridico que se mantiene en solución tras el tratamiento con etanol en frío. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm y se recogió el sobrenadante que constituyó la fracción oligosacáridica procedente de las respectivas digestiones enzimáticas. Las fracciones obtenidas por este procedimiento se liofilizaron y conservaron en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 8.** Representación gráfica de los pasos a seguir para la obtención de fracciones oligosacáridicas procedentes de la digestión enzimática de AIR o fr. KOH. En la figura se muestra el ejemplo para la digestión enzimática con GH11. (Gráfico de elaboración propia en base a imágenes tomadas de BioRender).

## **5. Análisis de la composición en azúcares de los productos de digestión enzimática**

### Composición en azúcares neutros de las fracciones oligosacáridicas por cromatografía iónica

Las fracciones oligosacáridicas liofilizadas procedentes de las digestiones enzimáticas con Driselasa y endoxilanas GH11 se hidrolizaron mediante tratamiento con ácido trifluoroacético 2N (1 mg/1 ml), a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 90 min.

Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se secaron mediante una corriente de nitrógeno. En último lugar, las muestras se redisolviéron en 1 ml de agua Milli-Q y como



tratamiento previo a la cromatografía iónica, se filtraron empleando un filtro PTFE (0,45 µm; Fisher Scientific) (Rebaque, 2021).

El análisis de monosacáridos se realizó mediante cromatografía iónica de alta presión, utilizando una columna Metrosep Carb2 (250 x 4,0 mm; Metrohm Hispania) montada en un cromatógrafo iónico LC 930 Compact IC Flex de Metrohm, equipado con un detector de pulso amperométrico (PDA). La temperatura de la columna fue de 25°C y el PDA fue de 35°C. Los monosacáridos se eluyeron a 0,6 ml/min, utilizando un gradiente salino de 1mM NaOH/1mM acetato sódico hasta 100 mM NaOH/170 mM acetato sódico durante 55 min con un equilibrado final de 25 min.

#### Cuantificación del contenido en azúcares totales

Para la cuantificación del contenido en azúcares totales (AT) obtenidos mediante digestión enzimática se utilizó el método colorimétrico del Fenol-Sulfúrico siguiendo el método descrito en Dubois *et al.* (1956). Los cálculos se realizaron en base a la siguiente recta patrón:  $A_{420} = 0,007 + 0,0089 [AT \mu\text{g/ml}]$ ; ( $R^2 = 0,997$ ). Se utilizó Glc (0-100 µg/ml) como estándar.

#### Cromatografía en capa fina (TLC)

Un volumen de cada muestra (7,5 µl) se cargó en placas de TLC de sílica-gel (Merck) y se cromatografiaron utilizando como fase móvil propanol: acetato de etilo: agua (45:35:20) durante 4 h (x2). Como marcadores externos se utilizaron (2 µl al 1% en agua) de arabinosa, xilosa, celobiosa, y celotriosa y un trisacárido de glucano mixto (MLG).

Para la visualización de los compuestos separados tras la TLC, se sumergió la placa en una solución de timol (0,5%) + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% en etanol al 96% y se calentó a 90°C durante 5-10 min en una estufa de aire.

### **6. Experimentos para la inducción de ROS**

#### Análisis de especies reactivas de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en discos foliares de maíz o plántulas de *A. thaliana*

Con este procedimiento se busca determinar la producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en porciones foliares de plantas de maíz o sobre plántulas de *A. thaliana* cultivadas en las condiciones anteriormente descritas.

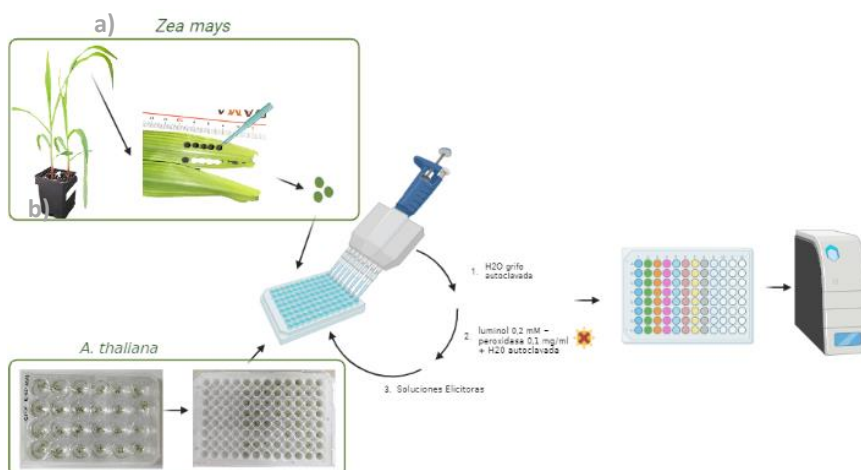
Para ello, se tomó una placa de 96 pocillos (Corning Costar 96) y a cada uno se le añadió 200  $\mu$ l de agua del grifo autoclavada. En el caso del maíz, se obtuvieron discos foliares de 4 mm con la ayuda de un punzón de biopsia a partir de la porción basal de la 4<sup>a</sup>/5<sup>a</sup> hoja verdadera de la de plantas de maíz de 10 días. Se introdujo un disco foliar por pocillo. En el caso de las plántulas de *A. thaliana* se transfirió una plántula de 7 días de edad a cada pocillo.

El material vegetal (discos foliares de maíz o las plántulas de *A. thaliana*) se mantuvo embebido en agua durante aproximadamente 18 h a 25°C bajo luz tenue. Posteriormente, el agua se sustituyó por 100  $\mu$ l de una solución de luminol 0,2 mM + peroxidasa (horseradish peroxidase Ec. 1.11.1.7) 0,1 mg/ml en agua destilada autoclavada, y se incubó en oscuridad durante 1 h (**Figura 9**).

Transcurrido ese tiempo, se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de las disoluciones elicitoras y se midió la luminiscencia como unidades relativas de luminiscencia (RLU) en un luminómetro Varioskan LUX, tomando registros cada 60 segundos durante 1 h. Las RLU totales se obtuvieron calculando la integral bajo las curvas cinéticas utilizando el SkanIt Software RE for Microplate Readers RE.

Como elicitores se utilizaron disoluciones de las fracciones oligosacáridicas obtenidas tras digestión con Driselasa o endoxilanas GH11 (1mg/ml) preparadas sobre agua destilada autoclavada. Estas disoluciones se incubaron en un thermoblock a 80°C durante 10 min y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Adicionalmente, se utilizaron H<sub>2</sub>O, oligosacáridos de chitosan (1  $\mu$ M Chi6), flagelina (1  $\mu$ M flg22) y oligosacáridos procedentes de glucano mixto (250  $\mu$ M MLG43) como soluciones para controles negativos (H<sub>2</sub>O) o positivos de elicitación (resto).



**Figura 9.** Representación gráfica de los pasos a seguir para el análisis de especies reactivas a oxígeno en discos foliares de maíz (a) o plántulas de *A. thaliana* (b). (Gráfico de elaboración propia en base a imágenes tomadas de BioRender).

## RESULTADOS

### 1. Caracterización de los productos de digestión enzimática obtenidos a partir del AIR y de la fracción hemicelulósica de pared celular

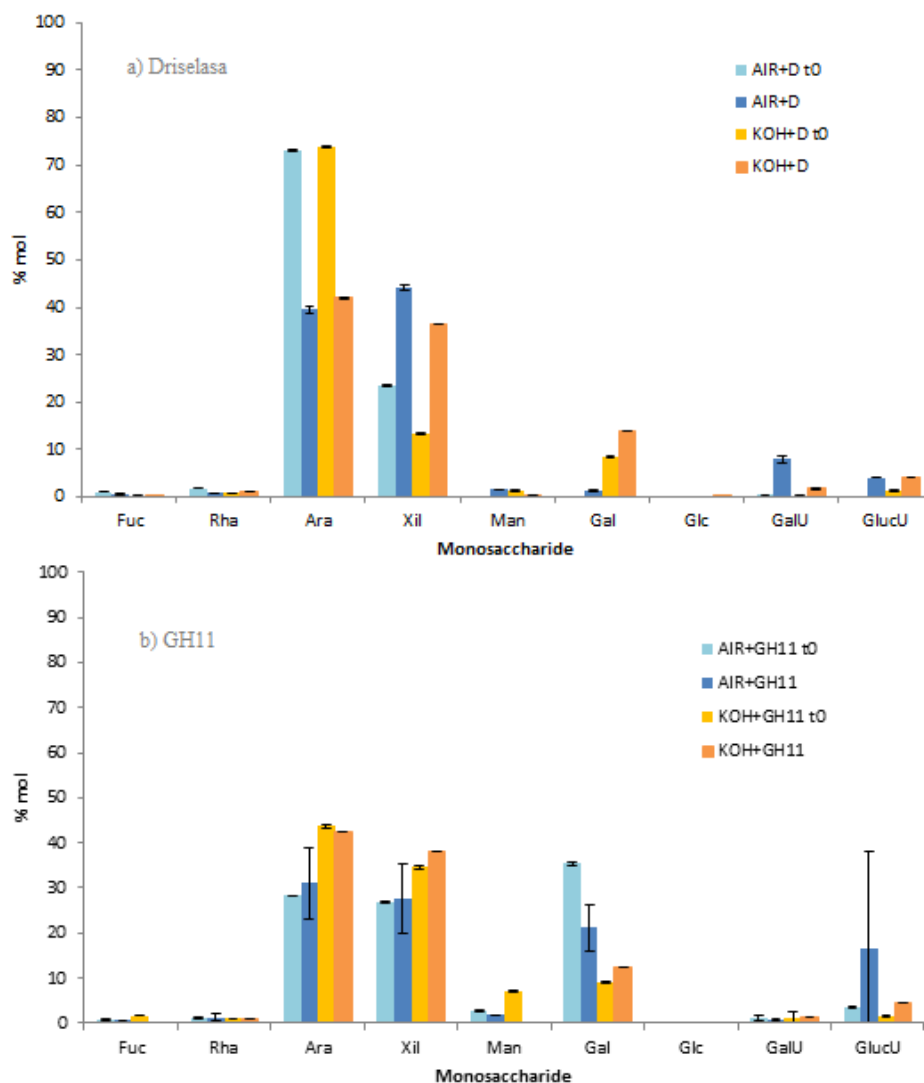
Se valoró el rendimiento de las digestiones con Driselasa y endoxilanas GH11 sobre las muestras de AIR y fr. KOH medido como cantidad de azúcares liberados en las fracciones oligosacáridicas (**Tabla 1**). Los valores fluctuaron entre 31 y 5 mg/g de sustrato. El rendimiento de la digestión fue superior en las muestras tratadas con Driselasa frente a las muestras digeridas con GH11. Asimismo, se liberaron más azúcares por digestión enzimática del AIR que por tratamiento de la fr. KOH, independientemente del tratamiento enzimático utilizado.

Como era de esperar, las muestras digeridas por enzimas presentaron valores mayores que sus respectivos controles de digestión a tiempo 0.

**Tabla 1.** Valores promedio de la concentración de azúcares totales obtenidas en las fracciones oligosacáridicas obtenidas tras digestión del residuo insoluble en alcohol (AIR) o fracción hemicelulósica (KOH) con Driselasa (D) o endoxilanas GH11 (GH11). Las muestras seguidas de t0 indican los controles obtenidos tras parar la reacción enzimática a tiempo 0. Se representa la media  $\pm$  ds (n=3).

Azúcares Totales (mg/g sustrato)							
AIR+D t0	AIR+D	KOH+D t0	KOH+D	AIR + GH11 t0	AIR + GH11	KOH + GH11 t0	KOH + GH11
1,80 $\pm$ 0,12	<b>31,20 <math>\pm</math> 2,65</b>	1,25 $\pm$ 0,30	<b>7,30 <math>\pm</math> 1,22</b>	0,40 $\pm$ 0,06	<b>12,60 <math>\pm</math> 1,25</b>	0,46 $\pm$ 0,08	<b>5,20 <math>\pm</math> 1,04</b>
Driselasa				Endoxilanas GH11			

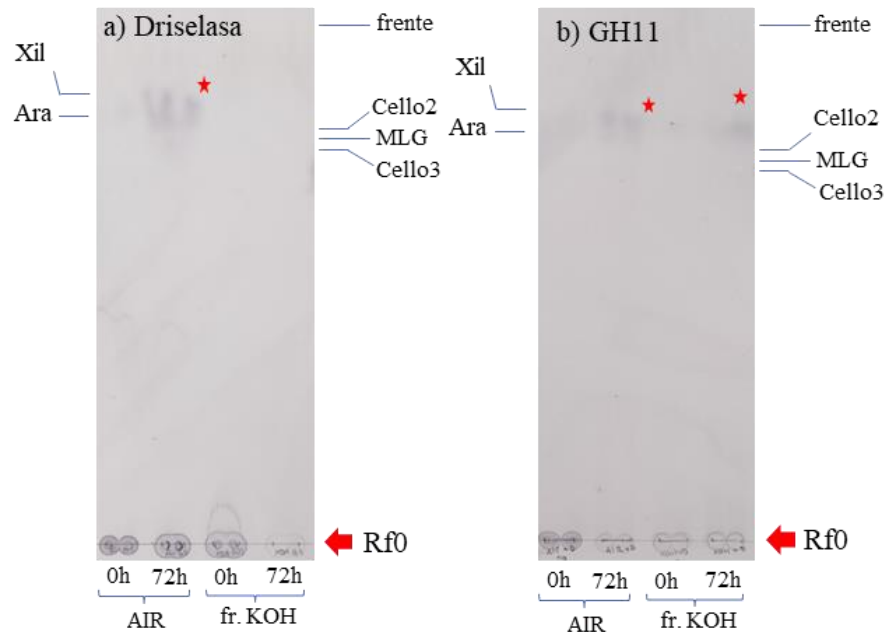
A continuación, se determinó la composición en monosacáridos presentes en cada una de las muestras (**Figura 10**). El compuesto más abundante fue la Arabinosa, seguido de la Xilosa y la Galactosa independientemente del tratamiento (Driselasa/endoxilanas GH11) y de la fracción utilizada (AIR/fr. KOH). El porcentaje molar de monosacáridos es mayor para la arabinosa en las muestras digeridas con Driselasa que en aquellas digeridas por la endoxilanas GH11. El porcentaje para la xilosa también es mayor en las muestras tratadas con Driselasa, aunque la variación no es tan evidente. Por último, para la galactosa, el porcentaje exclusivamente es mayor en las muestras de AIR tratadas con endoxilanas GH11. El ácido glucurónico, aunque en una proporción muy escasa, también tiene representación en las muestras.



**Figura 10.** Composición en monosacáridos de las fracciones oligosacáridicas obtenidos tras la digestión enzimática del residuo insoluble en alcohol (AIR) o fracción hemicelulósica (KOH) con (a) Driselasa (D) o la (b) endoxilanasas GH11 (GH11). Las muestras seguidas de t0 indican los controles obtenidos tras parar la reacción enzimática a tiempo 0. Se representa la media y ds (n=3). Fucosa (Fuc), Rhamnosa (Rha), Arabinosa (Ara), Xilosa (Xil), Manosa (Man), Galactosa (Gal), Glucosa (Glc), Ác. galacturónico (GalU) y Ác. glucurónico (GlucU). (Gráficos realizados con Excel).

Por su parte, tanto las muestras de AIR como las fr. KOH presentan porcentajes molares similares entre ellos, mayores en las muestras tratadas con Driselasa y menores en aquellas tratadas con endoxilanasas GH11.

Por último, se caracterizaron mediante TLC la diversidad de productos liberados tras las digestiones enzimáticas de los diferentes sustratos (**Figura 11**). Esta técnica permite caracterizar cualitativamente muestras complejas compuestas por mono, oligo y polisacáridos.



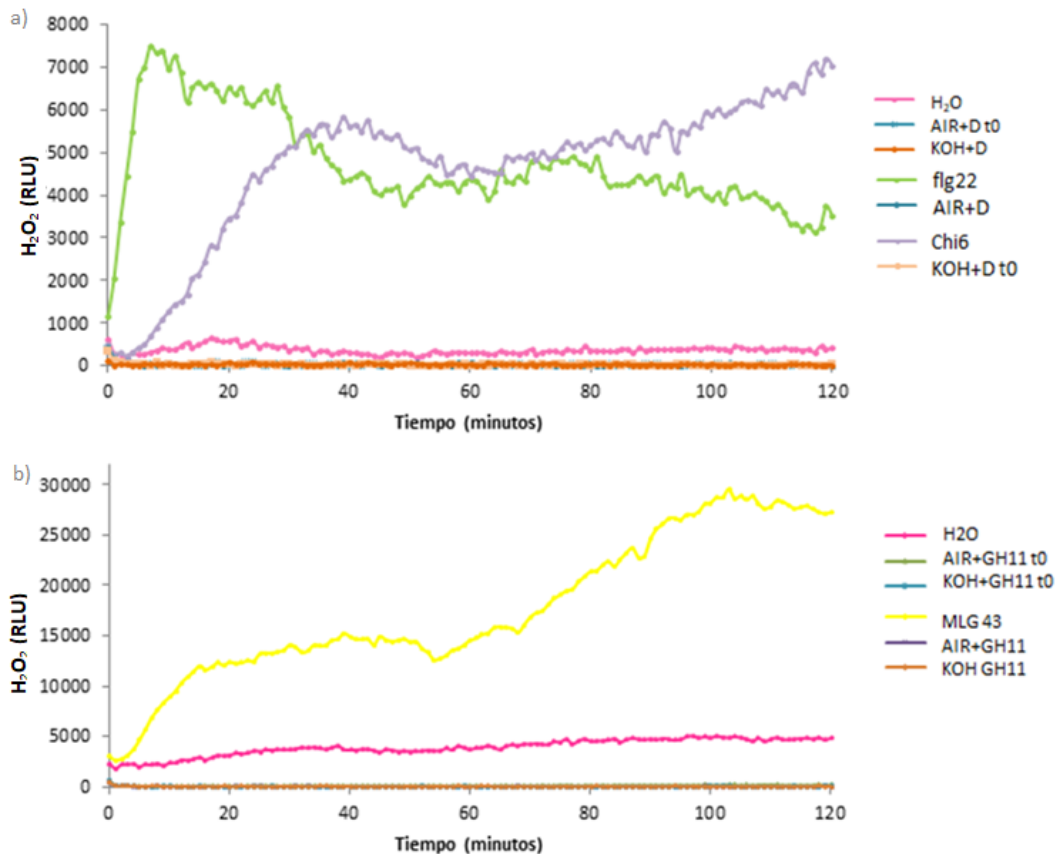
**Figura 11.** TLC de la fracción oligosacáridica obtenida tras digestión enzimática con (a) Driselasa o (b) endoxilanasas GH11 del residuo insoluble en alcohol (AIR) o la fracción hemicelulósica (fr. KOH). Las muestras anotadas con 0h corresponden a los controles obtenidos tras parar la reacción enzimática a tiempo 0. Se indica la posición de los marcadores externos (Xil: xilosa; Ara: arabinosa; Cello2: celobiosa; Cello3: trisacárido de glucano mixto: MLG).

Los resultados obtenidos indican que, independientemente del tratamiento enzimático empleado, la mayor parte de los productos de liberación enzimática se encontraron a Rf0 (flecha en **Figura 11**) indicando que probablemente corresponden a oligosacáridos con un grado de polimerización superior a 5. Las digestiones completas (72h) con Driselasa y endoxilanasas GH11 liberaron, tanto en AIR como en la fracción KOH, cantidades detectables de un compuesto que migra entre la arabinosa y la celobiosa (estrella en **Figura 11**). En ningún caso se detectaron compuestos compatibles con disacáridos, trisacáridos u oligosacáridos de bajo grado de polimerización (entre 3-5).

## 2. Inducción de ROS en discos foliares de maíz tras el tratamiento con fracciones oligosacáridicas de pared celular de maíz

A través de la producción de  $H_2O_2$  en discos foliares de maíz, se midió la capacidad elicitora de las fracciones oligosacáridicas obtenidas por digestión enzimática del AIR y fracción hemicelulósica (KOH) tratadas enzimáticamente con Driselasa (AIR+D, KOH+D) (**Figura 12 a**) y la endoxilanasas GH11 (**Figura 12 b**). La producción de  $H_2O_2$  se mide de forma indirecta gracias a una reacción de quimioluminiscencia que emite luz de forma proporcional a la cantidad de  $H_2O_2$  liberada.

Las muestras “problema” se analizaron comparándolas con flg22, Chi6 como controles positivos (que se sabe con certeza que generan respuesta), y con H<sub>2</sub>O como control negativo (que no la genera). Este procedimiento se realizó con el fin de determinar los compuestos que detecta la planta de su propia pared celular como DAMP para iniciar la respuesta defensiva. Aquellas disoluciones que producen mayor liberación de peróxido de hidrógeno por parte de los discos foliares, son las que mayor respuesta inducen en la planta.



**Figura 12.** Generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en discos foliares de la 4<sup>a</sup>/5<sup>a</sup> hoja verdadera en respuesta a la incubación con diferentes soluciones elicitoras. Se ensayaron las fracciones oligosacáridicas obtenidas por tratamiento enzimático con (a) Driselasa o (b) endoxilanas GH11 a partir del AIR (AIR+D; AIR+GH11) y de la fracción hemicelulósica (KOH+D; KOH+GH11). Las muestras anotadas con 0h corresponden a los controles obtenidos tras parar la reacción enzimática a tiempo 0. Se utilizó agua destilada (H<sub>2</sub>O) como control negativo. Se utilizaron soluciones de flagelina (flg22), oligosacárido de quitosán (Chi6) y un trisacárido de glucano mixto (MLG 43) como controles positivos de elicitación. (Gráficos realizados con Excel).

Una clara producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras procedentes de la fr. KOH indicaría que los oligosacáridos desferuloilados derivados de hemicelulosas son suficientes para desencadenar la respuesta inmune en plantas. Sin embargo, si fueran las muestras de AIR las que desencadenasen mayor respuesta, indicaría que los residuos de ácido ferúlico son importantes para la respuesta defensiva.

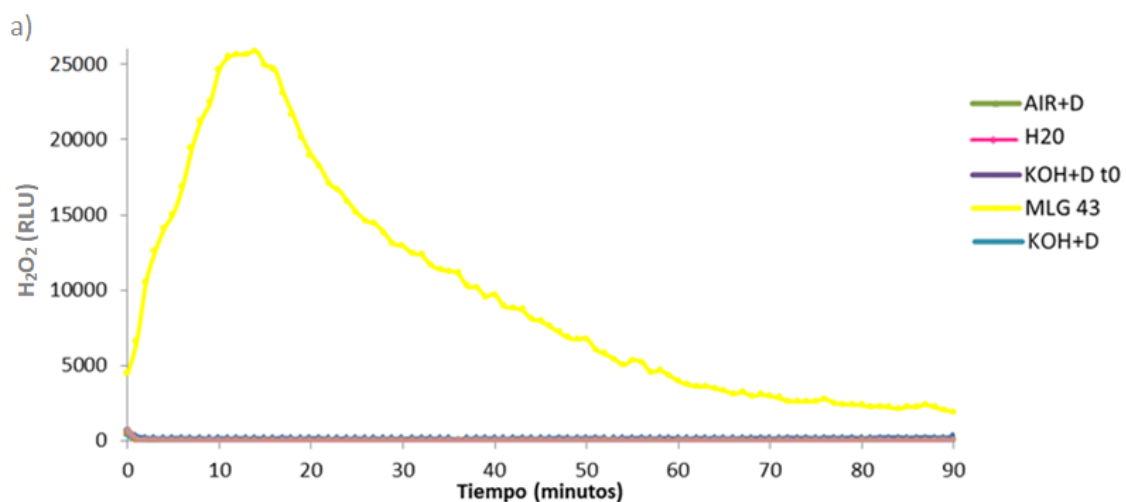
Por su parte, si las muestras tratadas con GH11 (enzima muy específica) presentasen mayor respuesta, indicaría que las muestras deben ser de menor tamaño para que la planta las reconozca; y viceversa en el caso de la Driselasa.

Tal como se muestra en la **Figura 12**, ninguna de las fracciones oligosacáridicas obtenidas por tratamiento enzimático del AIR o de la fr. KOH procedente de hojas de maíz desencadenó la producción de  $H_2O_2$ , y por tanto, sus componentes no son capaces de generar respuesta inmune en la planta.

### 3. Inducción de ROS en plántulas de *A. thaliana* tras el tratamiento con fracciones oligosacáridicas de pared celular de maíz

De forma análoga al caso anterior, se analizó la producción de  $H_2O_2$  en plántulas de *A. thaliana* (**Figura 13**). En este caso, como muestras “problema” se utilizaron las fracciones oligosacáridicas obtenidas tras digestión con Driselasa procedentes del AIR o de la fracción hemicelulósica o fr. KOH (a excepción de AIR+D a tiempo 0). Como control positivo se utilizó MLG 43, y como control negativo  $H_2O$ .

Al igual que sucede en el caso del maíz, ninguna de las soluciones elicitoras testada como problema indujo respuesta inmune en plántulas de *A. thaliana*.



**Figura 13.** Generación de  $H_2O_2$  en plántulas de *A. thaliana* tras el tratamiento con diferentes soluciones elicitoras. Se ensayaron las fracciones oligosacáridicas obtenidas por tratamiento enzimático con Driselasa a partir del AIR (AIR+D) y de la fracción hemicelulósica (KOH+D). Las muestras anotadas con 0h corresponden a los controles obtenidos tras parar la reacción enzimática a tiempo 0. Se utilizó agua destilada ( $H_2O$ ) como control negativo. Se utilizó una solución de un trisacárido de glucano mixto (MLG 43) como control positivo de elicitación. (Gráfico realizado con Excel).

## DISCUSIÓN

Las plantas están sometidas a numerosos estreses bióticos, y como se ha podido comprobar, la pared celular es esencial para la defensa de las plantas (Bacete *et al.*, 2018). Es la primera barrera física contra organismos patógenos, y sufre remodelaciones para prevenir la infección. No solo actúa como barrera física, sino que su modificación puede desencadenar la producción de moléculas señalizadoras y estimular las respuestas defensivas (Wan *et al.*, 2021). Mantener la integridad de la pared celular es importante para mantener el correcto funcionamiento del sistema de defensa innato de las plantas (Vaahtera *et al.*, 2019).

La mayor parte de las técnicas utilizadas para el control de plagas y de microorganismos dañinos se basan en el uso de agentes químicos tóxicos (Zehara *et al.*, 2021). En este estudio forma parte de una nueva estrategia basada en la utilización de DAMPs para mejorar la resistencia de los cultivos (Mélida *et al.*, 2020), de una forma respetuosa con el medio ambiente y segura para el consumo humano.

Uno de los objetivos de este trabajo era la obtención de oligosacáridos procedentes de la pared celular de maíz. Para ello se partió de muestras procedentes de AIR, fundamentalmente compuesto por pared celular. Adicionalmente se obtuvieron fracciones enriquecidas específicamente en hemicelulosas ya que se extrajeron del AIR mediante tratamiento con KOH, un método clásico para la obtención de hemicelulosas (Mélida *et al.*, 2009).

Tanto el AIR como la fracción hemicelulósica se trataron con enzimas hidrolíticas específicas para polisacáridos de la pared celular y se sometieron a una precipitación diferencial con etanol. De esta manera se obtuvieron fracciones ricas en oligosacáridos procedentes de la degradación enzimática de la pared celular (AIR) o de sus hemicelulosas (fr. KOH).

La digestión enzimática se llevó a cabo utilizando Driselasa o endoxilanasas GH11. Los resultados indicaron que el rendimiento de la digestión enzimática fue mayor para el tratamiento con Driselasa que con endoxilanasas GH11 (**Tabla 1**). Como era de esperar, las digestiones enzimáticas también presentan una mayor concentración en monosacáridos que las muestras a t0 (**Tabla 1**). Al tratar las muestras de pared celular con una enzima, los enlaces de los polisacáridos presentes en su estructura se rompen y se liberan mono, oligo y polisacáridos de menor tamaño. Tal como se indicó, las muestras tratadas con Driselasa presentan mayor concentración monosacáridica que las tratadas con GH11 (**Tabla 1**). Esta diferencia reside en las distintas especificidades enzimáticas y a sus respectivos mecanismos



de acción. La Driselasa contiene una combinación de diferentes enzimas, es decir; tiene varias actividades líticas diferentes (celulasas, laminarinasas, xilanasas, pectinasas) (López, sin fecha) y por tanto realiza más cortes (de forma inespecífica) en la pared celular que la endoxilanasas GH11. Esta segunda es específica para la hidrólisis de xilanos, y por tanto presenta menor actividad en la degradación de otros componentes formadores de la pared celular.

A la vista de los resultados reflejados en la **Tabla 1**, se cree que el rendimiento de las hidrólisis enzimáticas fue bajo. En particular, la muestra AIR+D manifestó la mayor liberación de azúcares, con un valor de 31,2 mg/g de sustrato, el cual también se considera escaso. Este rendimiento pobre pudo afectar a los experimentos de ROS que se realizaron a partir de estas muestras.

En todas las muestras de pared celular tratadas con endoxilanasas GH11 o Driselasa, los principales monosacáridos encontrados fueron: la arabinosa, xilosa, ác. glucurónico, galactosa y manosa (**Figura 10**). Los tres primeros son los componentes predominantes de las hemicelulosas más abundantes en las paredes celulares del maíz: los AXs y GAX (Scheller y Ulvskov, 2010). Además de los mencionados, aparecen galactosa y ác. galacturónico que se encuentra en las pectinas, compuestas de cadenas de galacturónico con ramificaciones laterales de galactosa (Wan *et al.*, 2021). Por tanto, podríamos concluir que los oligosacáridos mayoritarios obtenidos tras las digestiones enzimáticas serían oligosacáridos de AX y GAX, y en un segundo orden los procedentes de pectinas.

Los resultados del análisis de monosacáridos indican que la composición es similar independientemente del tratamiento enzimático utilizado (**Figura 10**). Sin embargo, esperamos encontrar diferencias en las decoraciones que acompañan a los oligosacáridos obtenidos. Hay que tener en cuenta que en las muestras procedentes del AIR aparecerán residuos de ácidos ferúlicos unidos a algunos oligosacáridos de AX o GAX. Sin embargo, en las muestras que proceden de la fr. KOH, al proceder de muestras extraídas con un álcali, los residuos de ác. ferúlico (se encuentran esterificados sobre los residuos de arabinosa) se perderán ya que el KOH es un agente desesterificante (Mélida *et al.*, 2009). En resumen, una de las diferencias que esperamos encontrar entre los oligosacáridos obtenidos directamente del AIR o de la fr. KOH, es que en este último caso no presentarán restos de ác. ferúlico en su composición.

Con los resultados de la TLC se puede determinar que los compuestos de las muestras presentaban un alto grado de polimerización ya que la mayor parte del material quedó en Rf0 (**Figura 11**) apoyando la teoría de que las enzimas no fueron suficientemente efectivas. Además, no se detectaron disacáridos, trisacáridos u oligosacáridos de bajo grado de polimerización y los únicos monosacáridos detectados comigraban con la arabinosa.

Uno de los objetivos del estudio se basaba en la caracterización de las moléculas inmunoestimulantes de la respuesta inmune procedentes de la pared celular de maíz. Los ensayos basados en ROS, son rápidos y manejables para medir la inducción de la PTI (Yu *et al.*, 2021), y como en estudios anteriores se demostró que las plantas de *A. thaliana* detectan los  $\beta$ -1,4-xilooligosacáridos de grados específicos de polimerización y que llevan decoraciones de arabinosa como DAMP (Mélida *et al.*, 2020), se pensaba que podía ocurrir lo mismo con el maíz. En este caso, se empleó el bioensayo de luminol para la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de los discos foliares de maíz, pero ninguna de las sustancias elicitoras procedentes del AIR o de la fracción hemicelulósica desencadenó respuesta (**Figura 12**). En conclusión, los compuestos presentes en las distintas sustancias elicitoras no fueron capaces de estimular la PTI en maíz, es decir; no se reconocen dichas moléculas como DAMPs.

Esto se puede deber al bajo rendimiento de hidrólisis enzimático por parte de la Driselasa y de la endoxilanas GH11 para romper la pared celular (**Tabla 1**). Otro factor a tener en cuenta, es que los oligosacáridos obtenidos tras la digestión eran de un tamaño demasiado grande para ser reconocidos por los PRR, como se manifiesta en la TLC (**Figura 11**). En estudios venideros se podría plantear el uso de algún otro tipo de enzima, que produjera oligosacáridos de menor tamaño y potencialmente inductores de respuesta inmune.

Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno pueden tener efectos negativos sobre la función celular si no se neutralizan. Por eso, las plantas cuentan con sistemas de defensa antioxidante que pueden eliminar rápidamente las ROS generadas (incluido el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) descomponiendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). Si dichos sistemas estuvieran activos y la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generada fuera baja, podría eliminarse antes de ser detectada. La ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no indica necesariamente una ausencia completa de ROS ya que también podrían generarse como otro tipo de respuesta (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, <sup>•</sup>HO,...).

En los experimentos de inducción de ROS con *A. thaliana*, una especie modelo para este tipo de trabajos (Mélida *et al.*, 2020), tampoco hubo respuesta por parte de las muestras elicitoras

procedentes de la digestión enzimática de polisacáridos de pared celular (**Figura 13**). Este experimento se realizó para descartar que el problema en la ausencia de producción de ROS en maíz, estuviera provocado por el estrés producido sobre los discos foliares al extraerlos con el punzón de biopsia. En este caso, al tratarse de plántulas completas, no habría estrés mecánico previo. Sin embargo, se trata de una dicotiledónea cuya pared celular difiere de la de maíz, por eso la ausencia de respuesta en no es tan reveladora como la realizada sobre los discos foliares de maíz.

Para finalizar la discusión y a modo de conclusiones podríamos indicar que el rendimiento enzimático inicial fue escaso, lo que repercutió a todo el estudio. No se pudieron determinar las moléculas inductoras de PTI, pero gracias a los resultados obtenidos pudimos determinar una posible causa y solución para futuros estudios. Además, se logró caracterizar los monosacáridos presentes en cada una de las muestras. En definitiva, los procedimientos empleados creo que fueron acertados, simplemente las enzimas utilizadas no fueron las óptimas para conseguir exitosamente los objetivos del estudio.

## REFERENCIAS

- Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., Molina, A. (2018) "Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses", *Plant Journal*, (4), pp. 614-636.
- Berlan, J.P. (2018) "Hybrid corn and the unsettled question of heterosis". *PubMed*, 97(5), 1075-1082.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003). "Lignin Biosynthesis". *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519-546
- Boutrot, F., Zipfel, C. (2017) "Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance", *Annual Review of Phytopathology*, (55), 257–286.
- Burton, R.A., Fincher G.B. (2009) "(1,3;1,4)-b-D-Glucans in Cell Walls of the Poaceae, Lower Plants, and Fungi: A Tale of Two Linkages" *Molecular Plant* 2(5), 873-882.
- Carpita, N. C., McCann, M. C. (2015). "Characterizing visible and invisible cell wall mutant phenotypes". *Journal of Experimental Botany*, 66(14), 4145 - 4163.
- De La Vega-Camarillo, E., Sotelo-Aguilar, J., Rios-Galicia, B., Mercado-Flores, Y., Arteaga-Garibay, R. I., Villa-Tanaca, L., Hernández-Rodríguez, C. (2023). "Promotion of the growth and yield of Zea mays by synthetic microbial communities from Jala maize". *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Dubois, M.; Gilles, K. a.; Hamilton, J. K.; Rebers, P.; Smith, F. (1956) "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *Anal Chem.*, 28 (3), 350–356.
- Elos, M. M., Enriquez, E. A., Benítez, A. L., Guerra, R. P., Moreno, L. A., Herrera, S. A. R. (2005). "Tasa de infección de la pudrición del tallo en maíz causada por *Fusarium moniliforme*". *Agronomía mesoamericana*, 17(1), 19.
- FAOSTAT (2022). Estadísticas de cultivos y productos de ganadería. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize> (Accedido: 24 de mayo de 2023).
- Fornalé, S., Rencoret, J., García-Calvo, L., Encina, A., Rigau, J., Gutiérrez, A., Del Río, J. C., Caparrós-Ruiz, D. (2016). "Changes In Cell Wall Polymers And Degradability In Maize Mutants Lacking 3'- And 5'- O - Methyltransferases Involved In Lignin Biosynthesis". *Plant and Cell Physiology*, pcw198.
- Gamboa, A., (1999) *Uso Tradicional de la Flora en Tres Comunidades de Cuquio, Jalisco y Propiedades Colorantes de Algunas Especies*. Tesis profesional. Universidad de Guadalajara.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). "Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. Antioxidants", 9(8), 681.
- Jones, J.D. y Dangl, J.L. (2006) "The plant immune system", *Nature*, (7117), pp. 323-329.

- Kato, Y., Nevins, D. J. (1985). "A (1→3)-β-d-Glucan Isolated From Zea Shoot Cell Wall Preparations". *Plant Physiology*, 78(1), 20-24.
- Kozlova, L. P., Nazipova, A., Gorshkov, O. V., Petrova, A., Gorshkova, T. (2020). Elongating maize root: zone-specific combinations of polysaccharides from type I and type II primary cell walls. *Scientific Reports*, 10(1).
- Largo, A. (2016) *Tolerancia adquirida en la habituación de cultivos de células de plantas a diclobenil y quinclorac: modificaciones en la pared celular y estrategia antioxidante*. Tesis doctoral. Universidad de León.
- López, C. (sin fecha). *Universidad de Málaga. [Protoplastos]*. Disponible en: <https://www.uma.es/estudios/centros/Ciencias/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS34/protop34.html> (Accedido: 09/07/2023)
- Lovell, J.T., MacQueen, A.H., Mamidi, S., Bonnette, J., Jenkins, J., Napier, J.D., Sreedasyam, A., Healey, A., Session, A., Shu, S., Barry, K., Bonos, S., Boston, L.B., Daum, C., Deshpande, S., Ewing, A., Grabowski, P., Haque, T., Harrison, M., Jiang, J., Kudra, D., Lipzen, A., Pendergast, T., Plot, C., *et al.* (2021). "Genomic mechanisms of climate adaptation in polyploid bioenergy switchgrass". *Nature*. 590: 438 – 444.
- Mélida, H., Bacet, L., Ruprecht, C., Rebaque, D., Del Hierro, I., López, G., Brunner, F., Pfrengle, F., Molina, A. (2020). "Arabinoxylan-Oligosaccharides Act as Damage Associated Molecular Patterns in Plants Regulating Disease Resistance". *Frontiers*, volumen(11).
- Mélida H., García-Angulo P., Alonso-Simón A., Encina A., Álvarez J., Acebes J.L. (2009) "Novel Type II cell wall architecture of dichlobenil-habituated maize calluses cells". *Planta* 229: 617-631.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021
- Mondino, P., Vero, S. (2006) "Control Biológico de patógenos de plantas" Facultad de agronomía – *Universidad de Educación Permanente. Área Agraria*;. 161 p.
- Montalvo, C., Lopez-Malo, A., Palou, E. (2012). "Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones", *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 6-2: 32-46.
- Paliwal, R.L. (2001) EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción. Disponible en: <https://www.fao.org/3/x7650s/x7650s10.htm> (Accedido: 04/05/2021)
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., De Souza, A., Schultink, A., Xiong, G. (2013). "Hemicellulose biosynthesis". *Planta*, 238(4), 627-642.
- Pfordt, A., Romero, L. R., Schiwiek, S., Karlovsky, P., von Tiedemann, A. (2020) "Impact of environmental conditions and agronomic practices on the prevalence of *Fusarium* species associated with ear- and stalk rot in maize", *Pathogens*, 9(3): 236.
- Quesada-Ocampo, L. M., Al-Haddad, J., Scruggs, A. C., Buell, C. R., Trail, F. (2016) "Susceptibility of maize to stalk rot caused by *Fusarium graminearum* deoxynivalenol and zearalenone mutants", *Phytopathology*, 106(8) 920–927.

- Rebaque, D. (2021). *Novel cell wall-derived oligosaccharides trigger immune responses and disease resistance in plants*. Tesis (Doctoral), E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (UPM).
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P. D., McRoberts, N., Nelson, A. (2019). “The global burden of pathogens and pests on major food crops”. *Nature Ecology and Evolution*, 3(3), 430-439.
- Scheller, H. V., Ulvskov, P. (2010). “Hemicelluloses”. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263-289.
- Somerville, C. (2006). “Cellulose Synthesis in Higher Plants”. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22(1), 53-78.
- Stukenbrock, E., Gurr, S. (2023). “Address the growing urgency of fungal disease in crops”. *Nature*, 617(7959), 31-34.
- Vaahtera, L., Schulz, J., Hamann, T. (2019). “Cell wall integrity maintenance during plant development and interaction with the environment”. *Nature plants*, 5(9), 924-932.
- Wan, J., He, M., Hou, Q., Zou, L., Yang, Y., Wei, Y., Chen, X. (2021). “Cell wall associated immunity in plants”. *Stress Biology*, 1(1).
- Wrzaczek, M., Brosché, M., Kangasjärvi, J. (2013) “ROS signaling loops — production, perception, regulation”, *Current Opinion in Plant Biology*, (5), pp. 575-582.
- Wolf, S., & Greiner, S. (2012). “Growth control by cell wall pectins”. *Protoplasma*, 249(S2), 169-175.
- Yu, J., Gonzalez, J. M., Dong, Z., Shan, Q., Tan, B., Koh, J., Zhang, T., Zhu, N., Dufresne, C., Martin, G. B., Chen, S. (2021) "Integrative proteomic and phosphoproteomic analyses of pattern- and effector-triggered immunity in tomato", *Frontiers in Plant Science*, 12: 768693.
- Zhong, R., Cui, D., Ye, Z. (2018). “Secondary cell wall biosynthesis”. *New Phytologist*, 221(4), 1703-1723.