



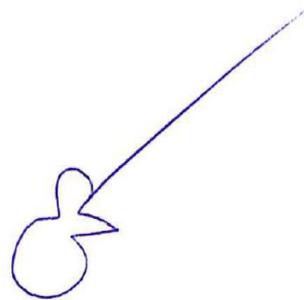
universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**TOXICIDAD DE ISOXABEN EN PLÁNTULAS Y  
CULTIVOS CELULARES DE MAÍZ**

**TOXICITY OF ISOXABEN IN MAIZE SEEDLINGS  
AND CELL CULTURES**



Cristian Melendre Pérez

**GRADO EN BIOLOGÍA**

**Septiembre, 2020**

## **Agradecimientos**

Mi más sincero agradecimiento al Área de Fisiología Vegetal por acogerme y resolver mis dudas. En especial a Laura y a los Drs. José Luis Acebes Arranz y Antonio Encina García por su preocupación genuina, y a mi tutor, el Dr. Jesús Miguel Álvarez Fernández por su inestimable ayuda.

Al Servicio de Microscopía de la Universidad de León por su asistencia.

A mis padres por confiar siempre en mi criterio, por aconsejarme y apoyarme en todo aquello que me he propuesto, y al resto de mi familia, comparta o no sangre conmigo, por ayudarme a seguir y sacarme una carcajada incluso en los días más duros.

## Índice

Introducción .....	1
1. Cultivo de maíz .....	1
2. Pared celular .....	1
3. Composición y estructura de la pared celular primaria .....	3
4. Celulosa.....	3
5. Polisacáridos matriciales .....	4
5.1 Hemicelulosas .....	4
5.2 Pectinas .....	6
6. Proteínas.....	6
7. Lignina .....	7
8. Plasticidad de la pared celular .....	7
9. Isoxaben .....	8
10. Cultivos celulares y habituación.....	9
Hipótesis y objetivos .....	9
Material y métodos.....	10
1. Material vegetal y condiciones generales de cultivo.....	10
1.1 Germinación de semillas .....	10
1.2 Tratamiento de isoxaben en plántulas .....	11
1.3 Cultivo “in vitro”.....	11
2. Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR).....	12
3. Valoración de celulosa. ....	12
4. Tinción de lignina por floroglucinol.....	13
5. Espectroscopía FTIR .....	13
Resultados .....	13
1. Efectos del isoxaben en plántulas de maíz.....	13
2. Efectos del isoxaben en callos de maíz.....	16
3. Análisis de la pared celular.....	19
Conclusiones .....	22
Referencias.....	23

## **Resumen**

El isoxaben es un herbicida que inhibe la biosíntesis de celulosa y altera la composición y estructura de la pared celular de plantas. El objetivo global de este trabajo es caracterizar la toxicidad del isoxaben en una monocotiledónea, el maíz. Se obtuvieron curvas dosis-respuesta mediante la exposición de semillas y callos de maíz al inhibidor. Los valores de  $I_{50}$  fueron: 10  $\mu\text{M}$  para la inhibición del crecimiento de la radícula, y  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$  para la inhibición de la ganancia de peso fresco y seco de los callos. Se ha utilizado espectroscopía FTIR y análisis cuantitativo de la celulosa para determinar el efecto de diferentes concentraciones de isoxaben (0;  $10^{-3}$ ; 0,2; 0,3  $\mu\text{M}$ ) sobre la composición de la pared celular después de una exposición a tiempo breve (30 días) y largo (callos habituados, que han crecido un mínimo de 60 días). El contenido de celulosa disminuye y aumenta el de compuestos fenólicos en callos de maíz, tanto a corto como a largo plazo. Por último, el isoxaben promueve lignificación ectópica de la pared celular en radículas, pero no en callos de maíz.

## **Palabras clave**

Cultivos celulares, espectroscopía FTIR, isoxaben, maíz, pared celular

## **Abstract**

Isoxaben is a herbicide that inhibits cellulose biosynthesis, modifying plant cell wall structure and composition. The overall aim of this work is to characterize isoxaben toxicity in a monocotyledon, maize. Dose-response curves were obtained through exposure of maize seedlings and cell cultures to isoxaben, determining the inhibitor's effect on root's length and on calluses weight gain.  $I_{50}$  values were: 10  $\mu\text{M}$  for root's growth inhibition and  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  for calluses fresh and dry weight inhibition. FTIR spectroscopy and cellulose quantification were used to evaluate isoxaben's different concentrations (0;  $10^{-3}$ ; 0,2; 0,3  $\mu\text{M}$ ) effects on cell wall composition, after a short time exposure (30 days) and a long time exposure (habituated calluses that have grown 60 days minimum). A reduction in cellulose cell wall content is shown, aswell as an increase in phenolic components content, in short and long time exposure. Isoxaben also promotes ectopic lignification in root's cell wall, but not in maize calluses.

## **Key words**

Cell cultures, cell wall, FTIR spectroscopy, isoxaben, maize

## **Introducción**

### **1. Cultivo de maíz**

El maíz es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las Poaceas de gran importancia económica a escala global. El área global de cultivos de maíz entre los años 2010 y 2013 fue de 150 millones de hectáreas, con una producción por encima de las 750 millones de toneladas, superando a los otros dos cereales más relevantes, el trigo y el arroz, con 650 y 470 millones de toneladas respectivamente.

La producción en los países de la Unión Europea es de 58 millones de toneladas métricas y España ocupa la sexta posición con 3,5 millones (<http://faostat.fao.org> 2020). El maíz tropical se cultiva en 66 países y es de importancia económica en 61 de ellos, cada uno de los cuales siembra más de 50.000 hectáreas con un total de cerca de 61,5 millones de hectáreas y una producción anual de 111 millones de toneladas métricas.

Las semillas de la planta de maíz son uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen, siendo muchos sus derivados alimenticios. El maíz tiene el más alto potencial para la producción de carbohidratos por unidad de superficie por día. Su valor nutricional y energético reside en el almidón de las semillas, mientras que el material lignocelulósico es considerado como residuo agrícola, que se emplea entre otros usos, para alimentar ganado o generar bioetanol. Es previsible que la demanda de maíz como alimento humano y animal crezca en las próximas décadas en los países en desarrollo a una mayor tasa que la del trigo o la del arroz.

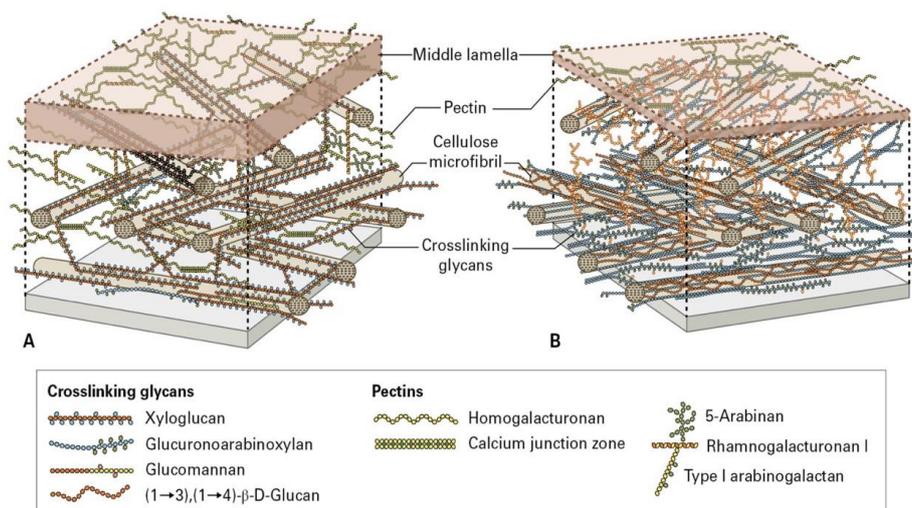
### **2. Pared celular**

La pared celular es una estructura semirrígida con funciones estructurales y fisiológicas imprescindibles para las plantas. Se encuentran rodeando el protoplasto de las células, con un grosor de 0,1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  guiando, restringiendo y determinando el crecimiento de las células (Ivakov y Presson, 2013; Bidhendi y Geitmann, 2015; Ali y Traas, 2016). Al ser la parte más externa de la célula actúa como barrera, regula el intercambio de metabolitos entre el protoplasto y el medio, y toma parte en el reconocimiento de patógenos o de señales provenientes de otras células o del entorno (Jacquet et al., 1995; Ikegawa et al., 1996; Piston et al., 2010). De esta forma, la pared celular tiene un papel crucial a la hora de que las células respondan a algún estrés, ya sea biótico o abiótico, o incluso en la propia especialización de los tejidos.

La formación de la pared celular comienza en la mitosis, con la aparición de la placa celular y de la lámina media. Entre la lámina media y la membrana plasmática de cada célula es donde se depositan las microfibrillas de celulosa, dando lugar a la pared celular primaria (Aspinall, 1980). En algunos tipos celulares se origina una pared celular secundaria entre la primaria y la membrana de la célula enriquecida en lignina (Kumar y Turner, 2015; Schneider y Persson, 2015).

Existe una gran heterogeneidad y diversidad estructural de paredes celulares, que puede considerarse en tres niveles. El primero es el nivel subcelular, que hace referencia a la estructura de la pared celular en una célula, es decir, al hecho de cómo los componentes varían dentro de una sola pared de una célula determinada. El segundo es el nivel tisular, que refleja la variabilidad entre tejidos, cómo los conjuntos de paredes celulares primarias y secundarias de diversos tipos de células y tejidos, difieren dentro de un órgano o planta. El tercer nivel se refiere a la variación entre diferentes especies, al grado de variación de un tejido determinado en diferentes especies.

Respecto al tercer nivel se conocen dos tipos de paredes celulares primarias. El tipo I, que se encuentra tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas y el tipo II, que es exclusivo de la subclase de las commeliníneas, dentro de las monocotiledóneas (Carpita y McCann, 2010).



**Figura 1.** Modelos estructurales de la pared celular primaria de tipo I (A) y tipo II (B) (Carpita et al., 2015)

### **3. Composición y estructura de la pared celular primaria.**

Todas las paredes celulares están formadas por un esqueleto de fibras de celulosa embebidas en una matriz constituida principalmente por polisacáridos hemicelulósicos y pécticos, junto a otros componentes como la lignina y diversas proteínas. Dependiendo de la especie de planta, la concentración y tipo de componentes varia. De forma general, la composición de una pared celular primaria suele ser: 40 a 50% de celulosa, 15 a 25% de hemicelulosas, 20 a 25% de lignina y 5 a 10% de proteínas.

La pared celular tipo I presenta cantidades similares de celulosa y xiloglucano, el polisacárido matricial mayoritario en estas plantas, unidos por puentes de hidrógeno, embebidos en una matriz constituida por polisacáridos pécticos, principalmente ramnogalacturonano I, homogalacturonanos, arabinanos y arabinogalactanos.

La especie modelo de este trabajo, el maíz, posee una pared celular primaria de tipo II, caracterizada por la elevada proporción de xilanos, bajo contenido en xiloglucanos, proteínas estructurales, y la práctica ausencia de pectinas. Un tipo de xilano ácido, el glucuronoarabinoxilano sustituye a las pectinas como principal polisacárido matricial, mientras que los arabinoxilanos unen microfibrillas de celulosa adyacentes, sustituyendo la función del xiloglucano en paredes celulares tipo I. En las paredes celulares tipo II es frecuente la presencia de compuestos fenólicos (Ishii, 1997). En concreto, derivados de ácidos hidroxycinámicos, como el ácido ferúlico, que aparecen esterificados sobre restos de arabinosa y xilosa de xilanos y xiloglucanos respectivamente (Ishii, 1997).

### **4. Celulosa**

La celulosa es un polímero cristalino formado por cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano estabilizadas entre si gracias a puentes de hidrogeno intra e intercatenales y fuerzas de van der Waals (Delmer, 1999; Saxena and Brown, 2000; Lerouxel et al., 2006). Además, las microfibrillas de celulosa están interconectadas por hemicelulosas y pectinas (Nishiyama, 2009; Wang et al., 2012) formando la red principal de la pared celular primaria.

Durante años se estableció que el número de cadenas de glucano que se disponían en paralelo para dar lugar a la microfibrilla eran 36 (Delmer 1999; Lerouxel et al., 2006) sin embargo, estudios más recientes lo cuestionan y en su lugar proponen agrupaciones de 18 o 24 cadenas por microfibrilla (Vandavasi et al., 2016; Jarvis 2018; Meents et al., 2018; Turner y Kumar 2018). El conjunto de microfibrillas genera una estructura cristalina de gran estabilidad, que sirve como andamiaje para el resto de componentes de la pared (Carpita et al., 2015).

La celulosa se sintetiza en la membrana plasmática por el complejo celulosa sintasa (CSC) que polimeriza las cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano a partir de UDP-glucosa (Delmer, 1999; McFarlane et al., 2014; Kumar et al., 2017). El complejo no solo cataliza la polimerización de glucosa, también interviene en la formación de la microfibrilla y orienta la deposición de esta en la pared celular (Peng et al., 2002).

Existe discrepancia a la hora de afirmar cómo es la estructura del complejo CSC. El modelo más aceptado establece que cada complejo posee una estructura hexamérica constituida por seis proteínas celulosa sintasa (CESA) (Cosgrove 2005; Somerville 2006).

Las proteínas CESA1, CESA3 y CESA6 son necesarias en la síntesis de celulosa en paredes celulares primarias (Arioli et al., 1998; Caño-Delgado et al., 2003; Desprez et al., 2007; Persson et al., 2007) mientras que CESA4, CESA7, and CESA8 están implicadas en la biosíntesis de celulosa de paredes celulares secundarias (Taylor et al., 1999; Brown et al., 2005; Mendu et al., 2011; McFarlane et al., 2014). Las restantes proteínas CESA (CESA2, CESA5, CESA9, and CESA10) participan en procesos específicos de tejidos y son parcialmente redundantes con CESA6 (Gardiner et al., 2003; Taylor et al., 2003; Persson et al., 2007).

Además de las proteínas CESA, existen otras proteínas asociadas implicadas en la síntesis de celulosa como la sacarosa sintasa, que proporciona las unidades de UDP-glucosa al CSC (McFarlane et al., 2014), la proteína KORRIGAN, que desenreda las cadenas de glucano recién formadas (Mansoori et al., 2014; Vain et al., 2014), o la proteína COBRA, que ayuda con el ensamblaje de las microfibrillas modificando su orientación (Roudier et al., 2005; Ben-Tov et al., 2018).

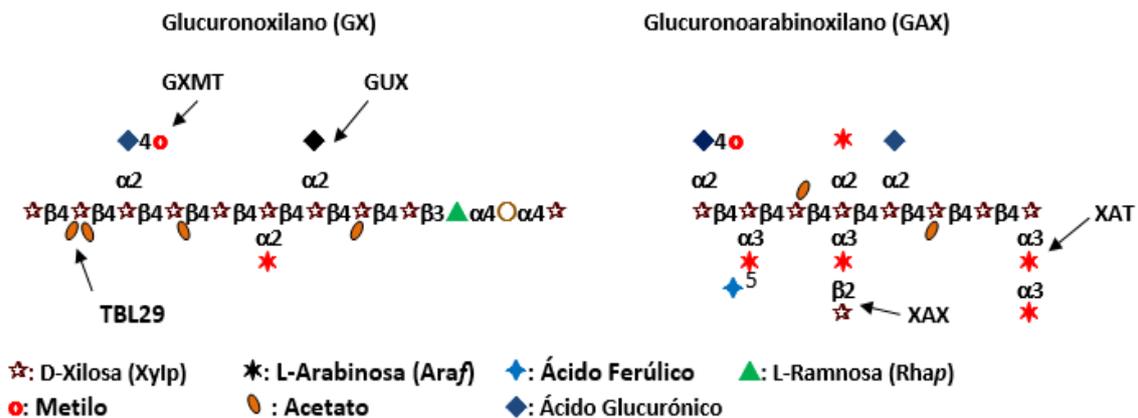
## **5. Polisacáridos matriciales**

Los polisacáridos no celulósicos son sintetizados en el aparato de Golgi y posteriormente transportados mediante vesículas a la pared celular (Lerouxel et al., 2006; Driouich et al., 2012; Anderson et al., 2016; Hatfield et al., 2017). Los más relevantes son las hemicelulosas y las pectinas.

### **5.1 Hemicelulosas**

Las hemicelulosas son un grupo de polisacáridos heteropolímeros de estructura amorfa formados por glucosa, xilosa y manosa (Pauly et al., 2013). Las hemicelulosas principales en las paredes primarias de tipo II son los xilanos (Peña et al., 2016). El esqueleto central de los

xilanos está formado por cadenas lineales de xilosas unidas por enlaces  $\beta$ -D-(1,4). Dependiendo del tipo celular y de la especie es frecuente encontrar sustituciones de los residuos de xilosas por otros como el ácido glucurónico, ácido metilglucurónico o la arabinosa (Pauly et al., 2013). En función de las sustituciones distinguimos entre (metil)glucuroxilanos, glucuronoarabinoxilanos y arabinoxilanos, siendo este último el más frecuente en paredes tipo II, y que se encargarían de formar puentes de hidrogeno con las microfibrillas de celulosa adyacentes para aumentar la estabilidad de la pared (Peña et al., 2016; Hatfield et al., 2017).



**Figura 2.** Estructura molecular de los arabinoxilanos. GXMT: Glucuronoxil metiltransferasa; GUX: Glucuronosil transferasa; TBL: acetil transferasa; XAT: Arabinosil transferasa; XAX:xilosil transferasa (Pauly et al., 2013).

Otra característica propia de las paredes celulares primarias tipo II es la presencia de fenoles esterificados sobre los polisacáridos. Los más frecuentes son los hidroxicinamatos, principalmente ácido ferúlico y *p*-cumárico (Faik, 2010; Ishii, 1997; Harris y Hartley, 1980). Debido a su elevada reactividad, los restos de ácido ferúlico pueden unirse a través de enlaces fenil-fenil o fenil-éter en una reacción catalizada por peroxidasas, formando entramados de ferulatos y *p*-cumaratos que también incluyen diferulatos y en menor extensión ciclodímeros de *p*-cumarato (Fry, 1986; Quideau y Ralph, 1997).

Los ácidos hidroxicinámicos se sintetizan en el citosol y se incorporan a las vesículas de Golgi que se liberan a la pared celular donde esterifican cadenas nacientes de arabinoxilanos/xiloglucano por hidroxicinamoil transferasas (Fry et al., 2000). La presencia de ferulatos varía entre especies de gramíneas y entre diferentes tejidos. En la semilla madura de maíz, la proporción de ferulatos:arabinoxilanos puede ser de casi 1:1, frente a 1:2 en la corteza del tallo (Hatfield y Chaptman, 2009).

Se acepta que los ferulatos incorporados en las paredes celulares de gramíneas podrían formar enlaces cruzados por los que se unirían a los polímeros de carbohidratos (Ishii, 1997). También forman enlaces covalentes con la lignina durante el proceso de lignificación (Quideau y Ralph, 1997). De tal forma que los ferulatos pueden actuar como lugares de nucleación en la formación de lignina (Ralph et al., 1995; Grabber et al., 1998) desde donde se extendería por el resto de la pared celular. Todo esto en conjunto resulta en un fortalecimiento de la estructura general de la pared, haciéndola más resistente a la degradación enzimática.

En cuanto al *p*-cumarato, no está claro la cantidad que contiene la lignina de las paredes celulares del tipo II, ni la función que desempeña la *p*-cumaroilación dentro de la pared celular. Una función propuesta de la unión de *p*-cumarato a las paredes celulares es que sea un mecanismo de transferencia de radicales, que contribuya en la formación de radicales monómeros de lignina, especialmente alcohol sinapílico (Takahama et al., 1996; Hatfield et al., 2008).

## **5.2 Pectinas**

Las pectinas son un conjunto de polisacáridos enriquecidos en ácido galacturónico y ramnogalacturonano. Son frecuentes en las paredes primarias de tipo I, sin embargo en las paredes tipo II no llegan a representar el 10% del peso seco de la pared (Carpita 1996; Caffall y Mohnen 2009). A pesar de que no sean tan frecuentes siguen participando en diversos procesos como la adhesión y expansión celular, transporte de iones, absorción y retención de agua, e incluso participan en la defensa contra patógenos, heridas y estrés abiótico (Verhertbruggen y Knox 2006; Wolf y Greiner 2012; Anderson 2016; Bethke et al., 2016).

## **6. Proteínas**

Las proteínas son un componente minoritario en las paredes celulares primarias, pero a pesar de ello resultan cruciales para el correcto desarrollo y funcionamiento de estas. Se distinguen dos tipos de proteínas en la pared celular, las estructurales, que se encuentran inmovilizadas en la pared mediante enlaces covalentes, y las solubles, que pueden estar ancladas o libres en el apoplasto y que normalmente poseen actividad enzimática (Lee et al., 2004).

Las proteínas estructurales interactúan con las de las membranas plasmáticas de las células participando en procesos como la división, adhesión o muerte celular, así como en la modificación de ciertos componentes de la pared.

Dentro de las proteínas solubles se encuentran numerosas enzimas como peroxidasas, transglicolicasas, hidroxilasas, quinasas o expansinas. Estas enzimas desempeñan un papel en la expansión de la pared celular, transporte molecular, reconocimiento celular y en la defensa contra patógenos (Rose et al., 2002; Novo-Uzal et al., 2009, Marowa et al., 2016).

## **7. Lignina**

La lignina es un polímero fenólico complejo con una elevada masa molecular y heterogeneidad. Es un material hidrófobo que expulsa el agua de los espacios de la matriz a medida que se va formando, disminuyendo la flexibilidad y permeabilidad de la pared. Se encuentra principalmente en las paredes celulares secundarias de ciertos tejidos especializados en el soporte estructural de la planta, o en el transporte de agua y solutos (Bonawitz and Chapple 2010). La lignina proporciona a las células soporte mecánico, rigidez e hidrofobicidad permitiendo a las plantas que crezcan en altura y puedan transportar agua y nutrientes (Zhao 2016). Además, la lignificación protege a las células de la degradación de la microfibrillas de celulosa, e incluso sirve de conexión entre los polisacáridos de la pared actuando como refuerzo (Pomar et al., 2002, Kärkönen and Koutaniemi 2010). Aunque la presencia de lignina es característica de las paredes secundarias, la lignificación puede ser provocada en paredes celulares primarias en respuesta a ciertas condiciones como heridas, estrés metabólico o infecciones (Caño-Delgado et al., 2003, Miedes et al., 2014).

La lignina se conforma por el ensamblaje de tres unidades fenilpropanoides distintas: *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S). Estas unidades resultan de la polimerización de monolignoles, que son los alcoholes *p*-cumárico, coniferílico y sinapílico (Ros Barceló 1997; Boerjan et al., 2003; Yamada et al., 2008; Vanholme et al., 2010; Fornalé et al., 2017). La composición de la lignina varía en función de la especie, tejido y condiciones ambientales. En el caso concreto de las monocotiledoneas, la lignina se compone principalmente por unidades G y S, además presenta una mayor cantidad de hidroxicinamatos que las dicotiledoneas (Boerjan et al., 2003; Li et al., 2016).

## **8. Plasticidad de la pared celular**

La pared celular es una estructura con una elevada plasticidad estructural. Esta plasticidad estructural hace referencia a cambios en la composición y arquitectura de la pared celular y se pone de manifiesto, entre otros casos, en algunos mutantes y ante diversas condiciones de estrés. Se desconocen muchos aspectos de la flexibilidad estructural, especialmente de las paredes celulares de tipo II, y de su posible relación con la tolerancia de las células vegetales

a factores de estrés. Un sistema experimental adecuado para abordar estas cuestiones consiste en la habituación de cultivos celulares a herbicidas inhibidores de la biosíntesis de celulosa. Los cultivos habituados se caracterizan por presentar una modificación considerable en la composición y estructura de sus paredes celulares.

Este estudio en concreto se centra en la respuesta de cultivos celulares de maíz adaptados a la presencia de un inhibidor de la biosíntesis de celulosa, el isoxaben.

## **9. Isoxaben**

El isoxaben (N-3-(1-etil-1-metilpropil)-5-isoxazolin-2,6-dimetoxibenzamida) forma parte de los herbicidas conocidos como CBIs, un grupo de moléculas sin relación estructural, pero que tienen en común que alteran la síntesis de celulosa, afectando a la polimerización de la glucosa, formación de la microfibrilla o a la orientación de esta en la pared celular. Dentro de este grupo se encuentran el diclobenil (DCB), la clortiamida, el flupoxam entre otros.

El Isoxaben es utilizado como herbicida de preemergencia en el control de malas hierbas dicotiledóneas en cultivos de cereales. Su actividad se basa en impedir el crecimiento de las plántulas en lugar de inhibir la germinación. Es activo en el rango nanomolar para varias plantas como *Arabidopsis* o *Brassica napus* (Desprez et al., 2002; Heim et al., 1989; Lefebvre et al., 1987; Desprez et al., 2002; Heim et al., 1989; Lefebvre et al., 1987). Sus efectos son similares a los que muestran las plantas tratadas con DCB, enanismo por inhibición del crecimiento tanto del hipocotilo como de la raíz. Además, al igual que otros CBIs, los órganos tratados con isoxaben generalmente se expanden radialmente, acumulan calosa y muestran lignificación ectópica (Desprez et al., 2002; Caño-Delgado et al., 2003). La inhibición de la biosíntesis de celulosa se acompaña de una serie efectos secundarios, como la inestabilidad y orientación de los microtúbulos, descrito también para el CBI diclobenil (Paredes et al., 2008) y la inducción específica de la muerte celular programada en suspensiones celulares de *Arabidopsis*, como es el caso de la taxtomina A, otro CBI (Duval et al., 2005).

El isoxaben también ha demostrado ser efectivo en rangos nanomolar en cultivos celulares *in vitro* de diversas especies como las ya mencionadas y también en soja (Heim et al., 1989; Corio-Costet et al., 1991; Díaz-Cacho et al., 1999).

El modo de acción sigue sin estar descrito por completo. Se cree que interactúa con un sitio de unión conformado por las proteínas CESA3 y CESA6 de tal forma que desestabiliza el complejo CSC, impidiendo su correcto funcionamiento (Paredes et al., 2006; DeBolt et al., 2007). Alternativamente, el isoxaben podría provocar un cambio conformacional de las

proteínas CESA, que a su vez bloquearía el supuesto canal necesario para la extrusión de la microfibrilla de celulosa (Desprez et al., 2002).

## **10. Cultivos celulares y habituación**

El uso de cultivos celulares *in vitro* ofrece dos ventajas sobre los cultivos tradicionales de plantas completas. La posibilidad de disponer de un número elevado de células en un espacio reducido en el que resulta fácil controlar y manipular diferentes condiciones y la posibilidad de seleccionar líneas con características específicas.

La habituación de cultivos celulares a CBIs manifiesta la gran plasticidad estructural de la pared celular con la finalidad de sobrevivir a un estrés, y constituye una estrategia experimental valiosa, especialmente útil para investigar la relación entre la composición y estructura de la pared celular de la planta y su función fisiológica. El proceso de habituación provoca numerosas modificaciones metabólicas que dependen del tipo de pared celular, de la concentración del CBI, así como del tiempo de exposición al inhibidor (Alonso-Simón et al., 2004, de Castro et al., 2015). Muchos de los cambios producidos por la habituación a CBIs son revertidos cuando las células son deshabitadas al cultivarse en medios sin la presencia del inhibidor (Shedletzky et al., 1990; Encina et al., 2002; García-Angulo et al., 2006).

En concreto, para este trabajo se han empleado callos de maíz. La habituación a CBIs también se ha logrado en tomate, tabaco, alubia, arabidopsis y cebada, y a varios CBIs, como DCB, isoxaben, quinclorac y taxtomina. Los cultivos habituados de estas especies manifestaban una serie de características comunes: tasas menores de crecimiento, células con morfologías irregulares que tendían a crecer en forma de agregados, y paredes celulares con bajos contenidos en celulosa que eran compensados por otros componentes de la pared como fenoles, pectinas o lignina.

### **Hipótesis y objetivos**

El isoxaben es un inhibidor de la biosíntesis de celulosa (CBI) cuyo modo de acción, si bien es desconocido al día de hoy, diversos resultados señalan que actúa de diferente forma a otros CBIs mejor caracterizados, como el diclobenil (Paredes et al., 2006; DeBolt et al., 2007, Desprez et al., 2002). Todo el trabajo realizado hasta el día de hoy con isoxaben fue realizado con especies dicotiledóneas, sin que se tenga conocimiento del logro de ningún resultado en monocotiledóneas.

Es muy probable que las especies monocotiledóneas respondan de forma general al isoxaben con alteraciones semejantes a las descritas en dicotiledóneas (Encina et al., 2001, 2002) y constituyan por tanto un buen sistema para estudiar la flexibilidad estructural de la pared celular. No obstante, existen marcadas diferencias entre la pared celular de dicotiledóneas y monocotiledóneas. El objetivo general de este trabajo es la caracterización de la actividad del isoxaben en maíz, una especie monocotiledónea. Para conseguirlo se caracterizará la toxicidad del isoxaben, estudiando el rango de concentraciones tóxicas y los efectos anatómicos y bioquímicos producidos por un tratamiento con isoxaben, tanto a corto como a largo plazo. La consecución de este objetivo se abordará mediante una serie de objetivos parciales:

1. Caracterizar los efectos morfológicos provocados por el isoxaben en plántulas de maíz. Se germinarán semillas de maíz en un gradiente de concentraciones de isoxaben y se valorará la alteración del porcentaje de germinación y el aspecto de las plántulas.
2. Determinar el efecto del isoxaben sobre la longitud de tallos y raíces de plántulas y sobre la ganancia de peso fresco y seco de callos de maíz. Se obtendrán en cada caso las correspondientes constantes de inhibición 50.
3. Obtener cultivos celulares habituados a bajas concentraciones de isoxaben, ligeramente superiores a la  $I_{50}$ , mediante el aumento paulatino de la concentración del inhibidor a lo largo del cultivo.
4. Analizar la alteración de la pared celular tanto a corto (tratamientos de choque) como a largo plazo (cultivos celulares habituados). Se utilizará espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR), se valorará el contenido de celulosa y se comprobará la posible formación de lignina (lignificación ectópica).

## **Material y métodos**

### **1. Material vegetal y condiciones generales de cultivo.**

#### **1.1 Germinación de semillas**

Para este estudio se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays*) de la variedad DK313. Las semillas se colocaron en recipientes de cristal con 3 discos de papel de filtro y 3 ml de la solución de herbicida correspondiente y luego se autoclavaron. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente mediante 2 lavados sucesivos con etanol al 70% y lavadas con

agua destilada y esterilizada. Los recipientes se sellaron y se colocaron primero en condición de oscuridad a 25°C dos días y luego en condición de luz a la misma temperatura durante 8 días.

### **1.2 Tratamiento de isoxaben en plántulas.**

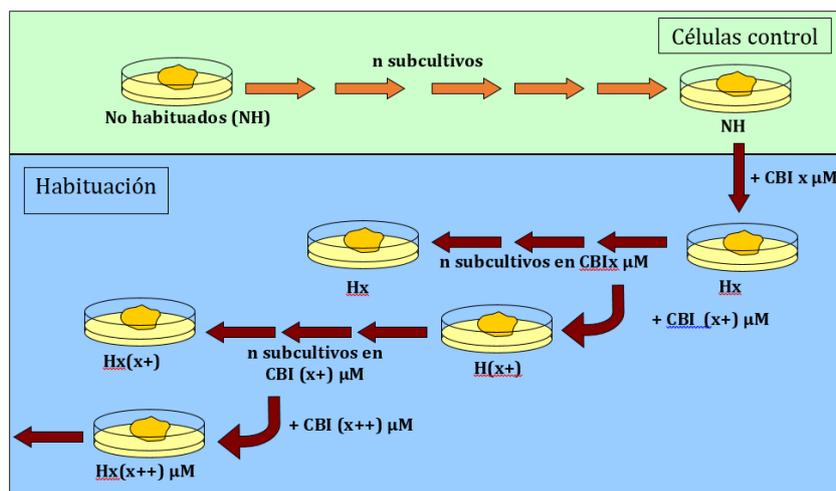
Para observar el efecto del herbicida sobre la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas, lotes de 10 semillas se trataron con concentraciones crecientes de isoxaben. Las concentraciones empleadas de isoxaben fueron 0µM, 10µM, 15µM, 25µM, 100µM y 200µM. El isoxaben fue previamente disuelto en etanol, una vez se comprobó que estas concentraciones de etanol no alteraban el crecimiento de las células.

Tras el periodo de germinación y crecimiento, se calculó el porcentaje de semillas germinadas y se midió la longitud de la parte aérea y de la raíz principal.

### **1.3 Cultivo “in vitro”**

Se partió de callos de maíz cedidos por el departamento obtenidos a partir de embriones inmaduros de maíz. Estos callos se encontraban en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y se siguieron subcultivando en dicho medio hasta obtener suficiente masa de callo para comenzar el estudio. Los subcultivos se realizaron aproximadamente cada 28 días en medio MS con 2,4-D 9 µM y sacarosa 20 g L<sup>-1</sup> a pH 5,8, 25°C y condición de luz.

Para la habituación de los callos estos se fueron transfiriendo de forma gradual a medios con concentraciones cada vez mayores de isoxaben, partiendo de 10<sup>-3</sup> µM hasta 0,3 µM. Entre cada transferencia se realizaron un mínimo de 2 subcultivos en la misma concentración. El crecimiento se expresó como el porcentaje respecto al control de peso fresco (PF) y seco (PS). El peso seco se obtuvo tras secar los callos en estufa a 60 °C durante dos días o hasta que el peso se mantuvo constante y se determinó la constante de inhibición (I<sub>50</sub>), o concentración de isoxaben capaz de inhibir en un 50% el crecimiento de los callos en comparación al material no tratado.



**Figura 3. Habitación de callos a inhibidores de la biosíntesis de celulosa (CBI).** NH: callos no habituados; n: número de subcultivos; Hx: callos habituados a una concentración x de isoxabén; Hx++: callos habituados a concentraciones crecientes de isoxaben.

## 2. Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR).

Para la obtención y estudio de las paredes celulares se emplearon callos control, tratados y habituados a las concentraciones  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$  y 0,3  $\mu\text{M}$ . Los callos fueron homogeneizados en mortero con nitrógeno líquido y tratados con etanol durante 5 días. La suspensión resultante fue centrifugada y lavada cinco veces con etanol y acetona asegurándose de mantener el precipitado y se secó en una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  para obtener el residuo insoluble en alcohol (AIR). El AIR fue tratado con dimetilsulfóxido y  $\alpha$ -amilasa para retirar los restos de almidón. El residuo se lavó con etanol y acetona, se trató con una solución fenol/ácido acético/agua (2:1:1) y por último se lavó cinco veces con etanol y acetona. El residuo con las paredes celulares fue secado en estufa a  $60^{\circ}\text{C}$ .

## 3. Valoración de celulosa.

La valoración de celulosa se realizó por el método Updegraff (Updegraff, 1969) y el de antrona (Dische, 1962). Tres gramos de cada muestra de paredes celulares fueron suspendidos en 3 ml de acético/agua/nítrico (8:2:1), se calentaron en agua hirviendo durante 30 minutos, se dejó enfriar, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con agua y acetona y se secó en estufa hasta obtener un peso constante. Este residuo finalmente fue resuspendido en ácido sulfúrico a  $110^{\circ}\text{C}$  para provocar la hidrólisis de las cadenas de glucano y liberar los azúcares. Un volumen de 0,5 ml de la muestra se trató con 1 ml de antrona 0,2% en sulfúrico concentrado, se incubó en agua hirviendo durante 5 minutos, se dejó enfriar y se midió la absorbancia a 620 nm.

#### **4. Tinción de lignina por floroglucinol**

La lignina se visualizó con floroglucinol, para ello se obtuvieron con bisturí secciones longitudinales de plántulas control y tratadas con 5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  concentraciones de isoxaben. Estas secciones se trataron durante 5 minutos con floroglucinol al 1% (v/w) preparado con etanol al 70%, se eliminó la solución de tinción por centrifugación y posteriormente se incubaron con HCl al 18%.

También se intentó detectar la presencia de lignina en callos control, tratados y habituados a concentraciones 10<sup>-3</sup>  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$  y 0,3  $\mu\text{M}$  de isoxaben. Se utilizó la misma tinción con floroglucinol que en el caso de las secciones de raíz.

Para la observación detenida y obtención de imágenes de las diferentes muestras se empleó una lupa Nikon SMZ 1500 con cámara incorporada.

#### **5. Espectroscopía FTIR**

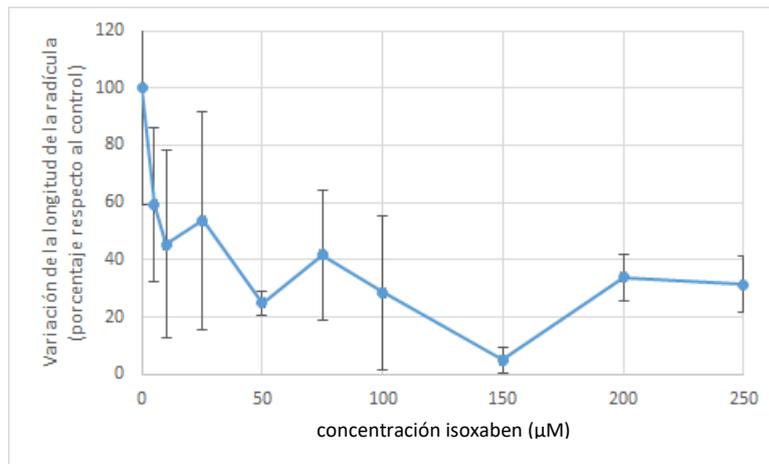
Se obtuvieron espectros FTIR de paredes celulares de callos control, tratados y habituados a las concentraciones 10<sup>-3</sup>  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$  y 0,3  $\mu\text{M}$ .

Para ello, se empleó un FTIR-4700 y el software Spectra manager. Los espectros obtenidos de cada muestra fueron procesados con el mismo programa seleccionando el intervalo de onda entre 800 y 1800  $\text{cm}^{-1}$ , se ajustó la línea base, se normalizaron los espectros y los datos fueron exportados en formato Excel.

### **Resultados**

#### **1. Efectos del isoxaben en plántulas de maíz**

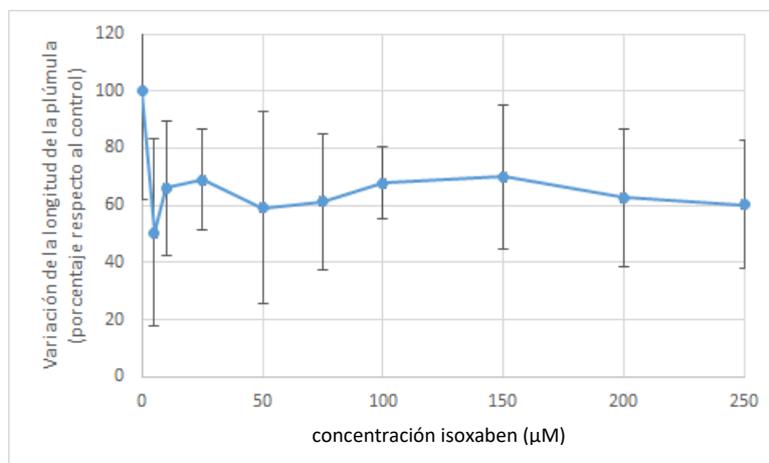
En este estudio se ha caracterizado la toxicidad del isoxaben en plántulas y en cultivos celulares de maíz. En primer lugar, semillas de maíz fueron germinadas en presencia de un gradiente de concentración de isoxaben entre 0 y 250  $\mu\text{M}$ . Concentraciones de isoxaben inferiores a 200  $\mu\text{M}$  no alteran el porcentaje de germinación, manteniéndose siempre cercano al 100%. Por el contrario, el crecimiento de las plántulas se inhibió en presencia de concentraciones iguales o superiores a 5  $\mu\text{M}$ , en un efecto que era dependiente de la dosis de isoxaben. La máxima inhibición se alcanzó en plántulas tratadas con isoxaben 150  $\mu\text{M}$ , con un valor de  $I_{50}$  de 10  $\mu\text{M}$  para las radículas (Fig. 4 y Fig. 6).



**Figura 4.** Efecto del isoxaben sobre la longitud de la raíz de plantas de maíz a los 12 días de iniciarse la germinación. Se representa la media del porcentaje respecto a plántulas no tratadas con isoxaben  $\pm$  la desviación estándar (n=20).

El rango de concentraciones de isoxaben inhibitoras del crecimiento de plántulas de maíz es superior al observado en especies dicotiledóneas, como *Arabidopsis* o *Brassica napus*, en las que el isoxaben inhibe el crecimiento de la raíz en el rango nanomolar, con valores de  $I_{50}$  de 1,5nM (Desprez et al., 2002), 4,5 nM (Heim et al., 1989), o 20 nM (Lefebvre et al., 1987). De hecho, el Isoxaben ha sido utilizado tradicionalmente como herbicida para el control de malas hierbas dicotiledóneas en cultivos de cereales.

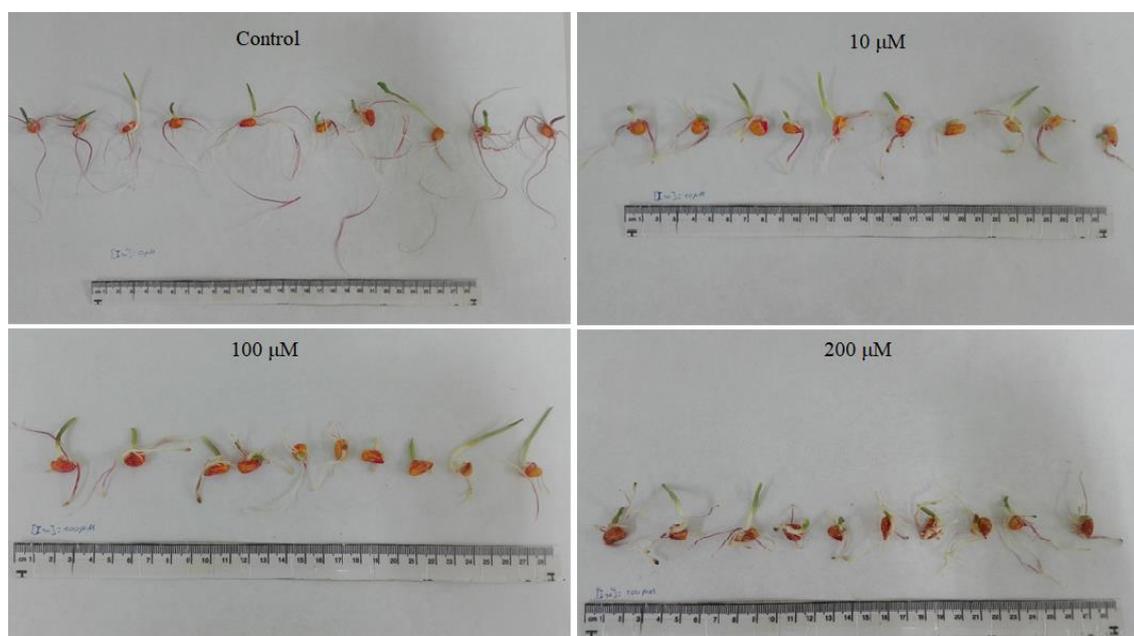
En comparación con el crecimiento de la raíz, el crecimiento de las plúmulas no se inhibía de manera tan drástica en el rango de concentraciones de isoxaben utilizado (Fig. 5). De hecho, el crecimiento de la plúmula se inhibe en un 40% en una concentración de isoxaben 5 µM y se mantiene en este valor en concentraciones mayores del inhibidor.



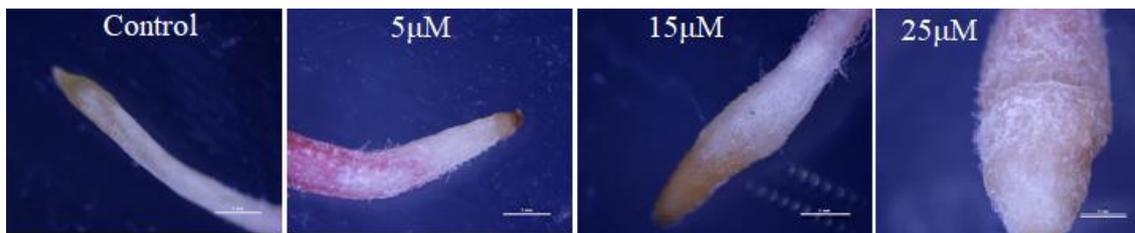
**Figura 5.** Efecto del isoxaben sobre el crecimiento de la plúmula de plántulas de maíz a los 12 días de iniciarse la germinación. Se representa la media del porcentaje de crecimiento respecto al control  $\pm$  la desviación estándar (n=20).

Paralelamente a la inhibición del crecimiento de la radícula, el isoxaben alteraba la morfología celular y, en consecuencia, la forma de la radícula. En presencia de isoxaben la zona subapical de la radícula se engrosaba (Fig. 7) como consecuencia de que las células se volvían más isodiamétricas y, por último, en las radículas de plantas tratadas con isoxaben aparecían zonas necróticas. Esta alteración morfológica, denominada "cell swelling", ha sido observada en plántulas de otras especies frente al isoxaben y otros inhibidores de la biosíntesis de celulosa (Desprez et al., 2002; Caño-Delgado et al., 2003) y se debe a una deposición anómala de la celulosa residual en la pared celular. Es importante recordar que el complejo enzimático de la membrana plasmática celulosa sintasa, cuya estructura y modo de acción aún no han sido totalmente esclarecidos, se encarga no solo de polimerizar la glucosa en cadenas  $\beta(1,4)$  glucano, sino también de asociar estas cadenas en microfibrillas de celulosa y de orientar la deposición de las microfibrillas en la pared celular. Esta orientación de las microfibrillas es responsable del crecimiento anisotrópico de la célula vegetal. De esta forma, la interacción del isoxaben con el complejo celulosa sintasa alteraría la forma de la radícula.

Los síntomas descritos en plántulas de maíz tratadas con isoxaben se manifestaban en la zona subapical de la radícula, concretamente en la región situada por encima del meristemo radicular. Ello se debe a que las células de esta zona se diferencian, comenzando dicho proceso por una expansión celular que demanda una mayor cantidad de celulosa, cuya síntesis es inhibida por el isoxaben.



**Figura 6.** Efecto del isoxaben sobre el crecimiento de plántulas de maíz tras 12 días de tratamiento.



**Figura 7.** Efecto de diferentes concentraciones de isoxaben ( $\mu\text{M}$ ) sobre la morfología de ápices radiculares de plántulas de maíz tras 12 días de tratamiento con la concentración indicada de isoxaben. Las barras corresponden a 1 mm.

La tinción con floroglucinol pone de manifiesto los grupos cinamaldehído de la lignina otorgando una coloración rojiza al tejido (Pomar et al., 2002). La deposición de lignina en la pared celular primaria, proceso denominado lignificación ectópica, ha sido descrito previamente como un importante mecanismo de defensa contra estreses bióticos y abióticos (Moura et al., 2010; Sattler and Funnell-Harris 2013; Miedes et al., 2014) y en nuestro caso podría verse como una respuesta por parte de la planta frente a la inhibición de la síntesis de celulosa que amenaza la pérdida de integridad de la pared celular. La lignificación ectópica fue dependiente de la dosis de isoxaben, aumentando su intensidad a medida que la concentración de isoxaben iba siendo mayor (Fig. 8).



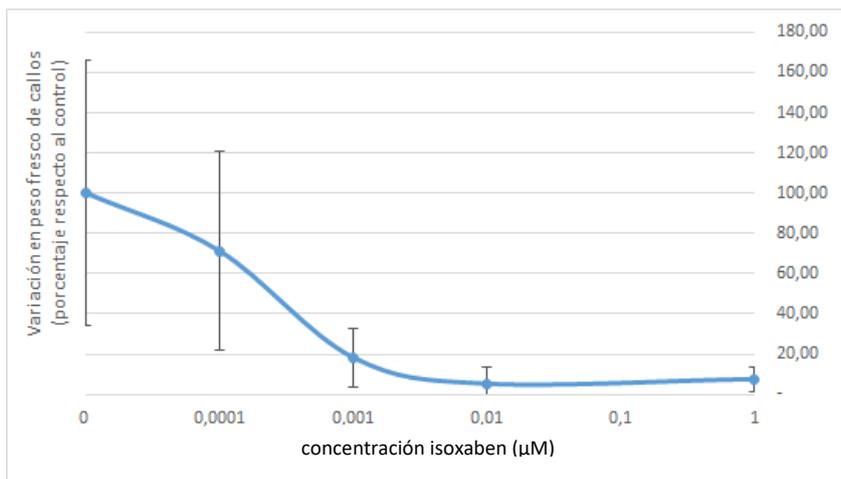
**Figura 8.** Efecto de diferentes concentraciones de isoxaben ( $\mu\text{M}$ ) en secciones longitudinales de ápices radiculares de plántulas de maíz teñidas con floroglucinol. Las barras corresponden a 1 mm.

## 2. Efectos del isoxaben en callos de maíz

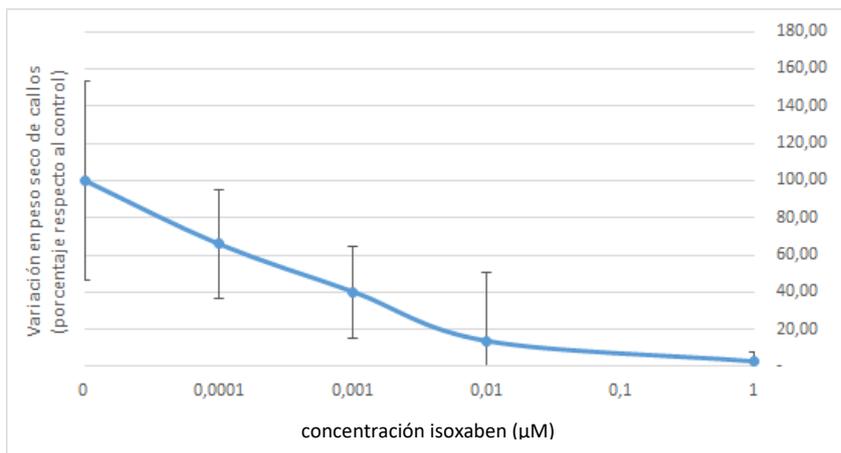
La actividad del isoxaben en callos de maíz se estudió a corto y largo plazo. En el estudio del efecto a corto plazo se utilizaron callos de maíz cultivados durante 30 días en presencia de concentraciones crecientes de isoxaben ( $0-1 \mu\text{M}$ ) y se determinó a continuación la variación de peso fresco (Fig. 9) y peso seco (Fig. 10). A diferencia de otros inhibidores, como el DCB (Encina et al., 2001, 2002), o la taxtomina A (Duval et al., 2005), el isoxaben inhibe el crecimiento de callos de maíz en el rango de concentración micromolar, con valores de  $I_{50}$  de  $10^{-4}$  y  $10^{-3} \mu\text{M}$  para la inhibición de la ganancia de peso fresco y seco. La actividad inhibidora de la ganancia de peso fresco del isoxaben en el rango nanomolar en especies

dicotiledóneas ha sido previamente observada en *Arabidopsis* ( $I_{50}=170$  nM) (Heim et al., 1989), suspensiones celulares de soja ( $I_{50}=80$  nM) (Corio-Costet et al., 1991), y callos de *Phaseolus vulgaris* ( $I_{50}=10$  nM) (Díaz-Cacho et al., 1999).

Cabe resaltar que el isoxaben se muestra más tóxico en cultivos celulares que en plántulas, debido probablemente a la organización tisular y a la presencia de diversas barreras, como la banda de Caspary en la endodermis de la raíz primaria, que dificultan la penetración del inhibidor.



**Figura 9.** Incremento del peso fresco de callos de maíz después de 30 días de cultivo en presencia de concentraciones crecientes de isoxaben. Se expresa la media del porcentaje de crecimiento respecto al control  $\pm$  la desviación estándar. n=8.

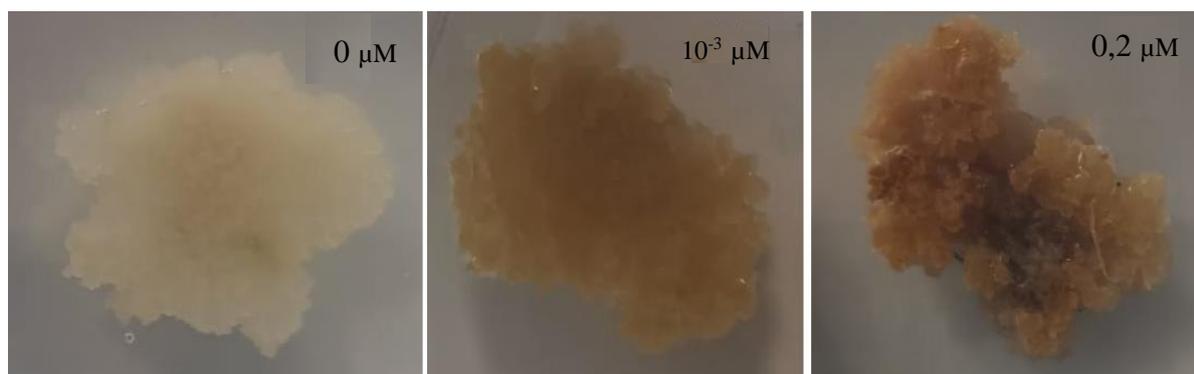


**Figura 10.** Incremento del peso seco de callos de maíz después de 30 días de cultivo en presencia de concentraciones crecientes de isoxaben. Se expresa la media del porcentaje de crecimiento respecto al control  $\pm$  la desviación estándar. n=8.

También se estudiaron los efectos del isoxaben en callos de maíz a largo plazo. Para ello se habituaron callos de maíz a crecer en presencia de concentraciones letales de isoxaben (concentraciones superiores a la  $I_{50}$  previamente determinada). La habituación se consiguió mediante el aumento gradual de la concentración del inhibidor en el medio de cultivo partiendo de concentraciones ligeramente inferiores a la  $I_{50}$  y aumentando posteriormente la concentración del inhibidor después de un mínimo de 2 subcultivos en una concentración determinada. Este proceso, ha sido conseguido en especies mono y dicotiledóneas y frente a

diversos inhibidores y ha permitido poner de manifiesto la plasticidad estructural de la pared celular en condiciones de estrés, ya que las células habituadas logran crecer en presencia del inhibidor gracias a una profunda modificación de la pared celular. Las paredes de las células de los cultivos habituados tienen características composicionales y estructurales específicas que dependen de la naturaleza del inhibidor, del tipo de pared celular del cultivo habituado, de la concentración del inhibidor y del tiempo en contacto con el inhibidor; estos dos últimos factores determinan el nivel de habituación logrado. No obstante, existen cambios estructurales que son comunes en los diversos tipos de cultivos habituados a inhibidores de la biosíntesis de celulosa: disminución del contenido de celulosa que se compensa con el aumento de otros polisacáridos, pectinas en paredes celulares del tipo I y hemicelulosas en células con paredes celulares tipo II. Estos cambios en la pared celular permiten, que los cultivos celulares habituados crezcan en presencia del inhibidor, aunque con tasas de crecimiento inferiores a las correspondientes de cultivos no habituados.

Los callos habituados a isoxaben presentaban un aspecto diferente al que tienen los callos no habituados (callos control) (Fig.11). Los segundos son callos homogéneos, de estructura friable y crecían perfectamente adheridos a la superficie del medio, mientras que los habituados eran más duros, más oscuros y crecían en forma de cúpula reduciendo la superficie de contacto con el medio.



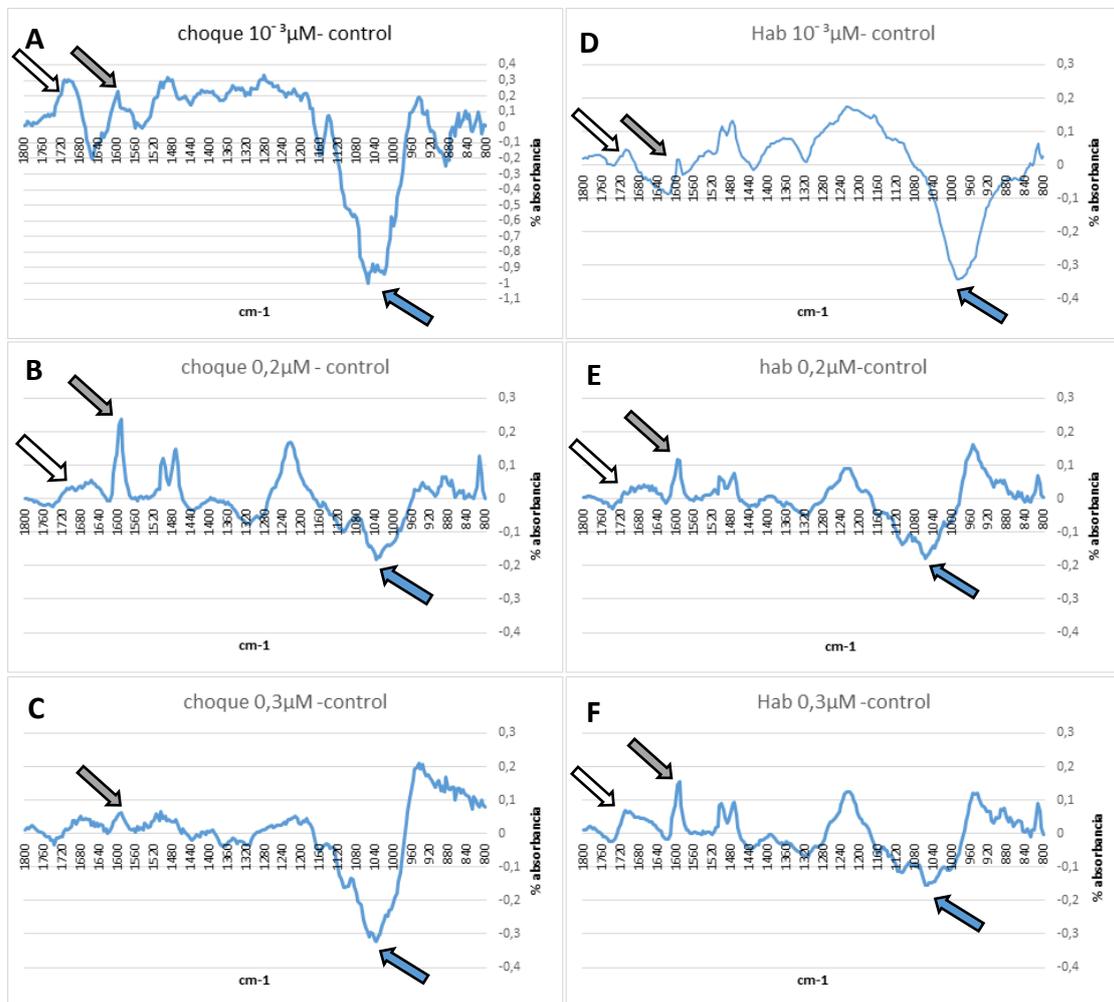
**Figura 11.** Aspecto de callos habituados a diferentes concentraciones de isoxaben ( $\mu\text{M}$ ) vistos desde la superficie de contacto con el medio de cultivo.

### 3. Análisis de la pared celular

En este trabajo se estudian por primera vez los cambios en la pared celular de tipo II asociados a la habituación a isoxaben. El análisis de la pared celular se realizó en las células de los tres tipos de callos: callos no habituados, callos habituados a isoxaben y callos no habituados tratados con isoxaben a corto plazo. Para estudiar el efecto a corto plazo se utilizaron callos control de maíz cultivados durante 30 días en presencia de  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$ ,  $0,2$   $\mu\text{M}$  y  $0,3$   $\mu\text{M}$  de isoxaben. Para el estudio del efecto del isoxaben a largo plazo se desarrolló un protocolo de habituación a isoxaben en el que callos de maíz se subcultivaron en concentraciones gradualmente crecientes de isoxaben hasta obtener callos tolerantes a esas concentraciones. Se utilizó espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR) en el intervalo de número de onda entre  $900$  y  $1800$   $\text{cm}^{-1}$  y se cuantificó la celulosa por el método de Updegraff. Así mismo, se estudió una posible lignificación ectópica de la pared celular.

Se ha detectado una considerable variación entre los espectros en la región de la huella digital ( $900$ – $1200$   $\text{cm}^{-1}$ ), que corresponde a la zona en la que absorben la mayor parte de los polisacáridos de la pared celular, incluyendo la celulosa (Alonso-Simón et al., 2011; Largo-Gosens et al., 2014) y en la región entre  $1.500$ – $1.750$   $\text{cm}^{-1}$ . Esta variación se manifiesta en los espectros diferencia, que se obtienen restando los espectros de las paredes de células de los callos control, a los espectros de callos tratados con isoxaben a tiempos cortos (Fig. 12 izquierda) y largos –habituación– (Fig. 12 derecha), (Fig. 12). En estos espectros diferencia se observa un pico negativo mayoritario en la zona digital ( $1.040$   $\text{cm}^{-1}$ ; flechas azules), muy probablemente asociado a la celulosa, que indica una menor cantidad de este compuesto en las paredes de células de callos tratados con isoxaben  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$ ;  $0,2$   $\mu\text{M}$  y  $0,3$   $\mu\text{M}$  respecto al control (callos no tratados) (Fig. 12A; Fig. 12B y Fig. 12C). Este pico también aparece en los espectros diferencia obtenidos restando a los espectros de paredes de células de callos habituados a cualquiera de las tres concentraciones de isoxaben:  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$ ;  $0,2$   $\mu\text{M}$  y  $0,3$   $\mu\text{M}$ , los correspondientes a las paredes de células de callos control (Fig. 12D; Fig. 12E y Fig. 12F). Este pico negativo representa el menor contenido de celulosa en las paredes de células de callos tratados con isoxaben a tiempos cortos o largos y es el resultado de la actividad inhibidora del isoxaben sobre la biosíntesis de celulosa. Este efecto también se observa cuando se valora la celulosa por el método de Updegraff en callos tratados con isoxaben en tiempos cortos y largos (callos habituados) (Fig. 13).

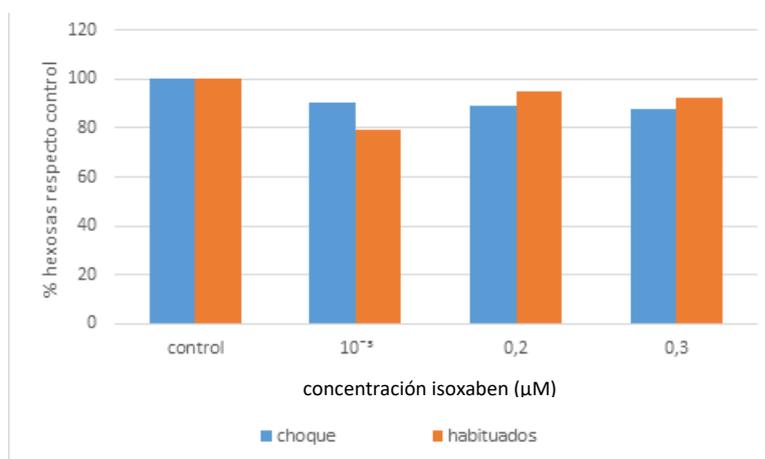
Además, también se observan picos positivos en longitudes de onda asociadas a anillos aromáticos ( $1.600\text{ cm}^{-1}$ ; flechas grises) y esteres fenólicos ( $1.720\text{ cm}^{-1}$ ; flechas blancas), y otros picos positivos minoritarios asociados a anillos fenólicos ( $1.500\text{ cm}^{-1}$ ) y aromáticos ( $1.515\text{ cm}^{-1}$ ), compatibles con una mayor cantidad de fenoles en ambos tipos de callos en comparación con los controles (Kačuráková et al., 2000; Alonso-Simón et al., 2011; Largo-Gosens et al., 2014).



**Figura 12.** Espectros diferencia FTIR. Izquierda: espectros diferencia obtenidos restando los espectros de callos control a los correspondientes a las paredes de células de callos tratados con isoxaben  $10^{-3}\ \mu\text{M}$  (A);  $0,2\ \mu\text{M}$  (B) y  $0,3\ \mu\text{M}$  (C). Derecha: espectros diferencia obtenidos restando los espectros de callos control a los correspondientes a callos habituados a isoxaben  $10^{-3}\ \mu\text{M}$  (D);  $0,2\ \mu\text{M}$  (E) y  $0,3\ \mu\text{M}$  (F).

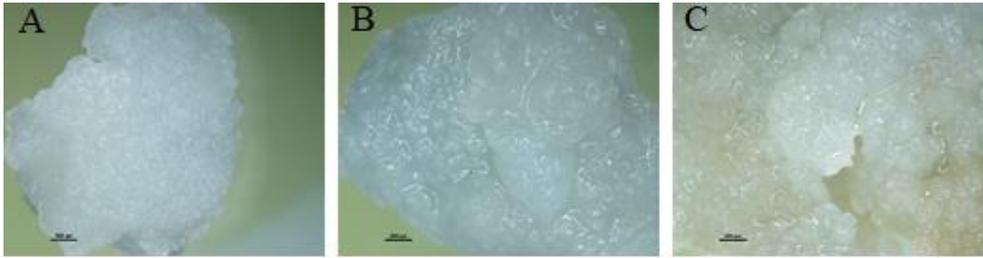
En el caso de las paredes de células de callos habituados a isoxaben, la existencia de estos picos positivos, asociados a compuestos fenólicos, podrían indicar un mayor entrecruzamiento de arabinoxilanos por puentes fenólicos, que compensaría la pérdida de rigidez de la pared celular debido a una disminución de celulosa. Esta compensación de la pérdida de celulosa

con arabinosilanos fuertemente entrecruzados por puentes fenólicos ha sido ampliamente documentada en callos de maíz habituados a diclobenil, otro inhibidor de la biosíntesis de celulosa (Mélida et al., 2009; de Castro et al., 2015). En callos de maíz habituados a diclobenil, la disminución de celulosa se detecta en bajos niveles de habituación (callos habituados a concentraciones de diclobenil en torno a su  $I_{50}$ ), aumenta drásticamente en niveles mayores de habituación y revierte cuando se retira el diclobenil del medio de cultivo (de Castro et al., 2015). Nuestros resultados, aun siendo preliminares, apuntan a que esta situación se repite frente al inhibidor isoxaben. En callos de alubia, cuyas células tienen otro tipo de pared celular (tipo I), habituados a isoxaben, la disminución del contenido de celulosa alcanza el 60% de la celulosa de la pared celular aunque en este caso la disminución de celulosa se acompaña de un fuerte aumento en el contenido de pectinas (Díaz-Cacho et al., 1999).



**Figura 13.** Comparación en el contenido de celulosa de callos de maíz bajo distintos tratamientos de isoxaben.

La lignificación ectópica suele formar parte de muchas respuestas a estreses en plantas. Sin embargo, a diferencia de lo observado en callos de maíz habituados a diclobenil, (Mélida et al., 2015), en ningún tipo de callo de esta especie tratado con isoxaben a tiempos cortos o largos se detecta lignificación ectópica cuando se realiza la tinción con floroglucinol (Fig. 14). Teniendo en cuenta que las plántulas de maíz tratadas con isoxaben sí forman lignina ectópica, este diferente comportamiento en callos puede deberse al bajo nivel de habituación llevada a cabo en este trabajo. En este sentido ha sido previamente observado que muchas de las respuestas que aparecen durante la habituación a inhibidores de la biosíntesis de celulosa depende de la concentración del inhibidor y del tiempo de exposición (Alonso-Simón et al., 2004; Mélida et al., 2009).



**Figura 14** Tinción con floroglucinol sobre callos control (A) choque 0,2  $\mu\text{M}$  (B) y habituado 0,2  $\mu\text{M}$  (C). Las barras corresponden a 500  $\mu\text{m}$ .

En resumen, los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Grado apuntan a que los efectos del isoxaben en maíz siguen en líneas generales los descritos con otros inhibidores de la biosíntesis de celulosa, como el bien caracterizado diclobenil: la pérdida de la rigidez mecánica de una pared celular empobrecida en celulosa se compensa, al menos en parte, con una modificación composicional y estructural de la pared celular que, en el caso del maíz, consistiría en un mayor contenido fenólico que permitiría establecer un mayor entrecruzamiento entre arabinosilanos. Futuros objetivos que se plantean serían la valoración del contenido de arabinosilanos en estos callos y la obtención de cultivos de maíz habituados a concentraciones mayores de isoxaben.

### **Conclusiones**

1. El isoxaben no altera el porcentaje de germinación de semillas de maíz, pero inhibe el crecimiento longitudinal de la radícula con  $I_{50}$  de  $10\mu\text{M}$  y el crecimiento de callos con  $I_{50} = 10^{-4}$  y  $10^{-3} \mu\text{M}$  sobre la inhibición de la ganancia de peso fresco y peso seco.
2. Se han obtenido callos de maíz habituados a crecer en concentraciones ligeramente superiores a la  $I_{50}$ .
3. El análisis por espectroscopía FTIR de la pared celular revela que el isoxaben inhibe el contenido de celulosa y aumenta el de compuestos fenólicos en callos de maíz tanto a corto como a largo plazo.
4. El isoxaben promueve la lignificación ectópica de la pared celular en la radícula, pero no en callos de maíz.

## **Referencias**

- Ali, O. y Traas, J. (2016) "Force-driven polymerization and turgor-induced wall expansion", *Trends in plant science*. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.019
- Alonso-Simón, A., García-Angulo, P., Encina, A., Álvarez, J.M., Acebes, J.L. y Hayashi, T. (2007) "Increase in XET activity in vean (*Phaseolus vulgaris* L.) cells habituated to dichlobenil", *Planta*, 226(3), pp. 765-771.
- Alonso-Simon, A., Encina, A., Garcia-Angulo, P., Alvarez, J.M. y Acebes, J.L. (2004) "FTIR spectroscopy monitoring of cell wall modifications during the habituation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures to dichlobenil", *Plant science*, 167(6), pp. 1273-1281.
- Alonso-Simón, A., García-Angulo, P., Mérida, H., Encina, A., Álvarez, J.M. y Acebes, J.L. (2011) "The use of FTIR spectroscopy to monitor modifications in plant cell wall architecture caused by cellulose biosynthesis inhibitors", *Plant signaling & behavior*, 6(8), pp. 1104-1110.
- Anderson, C.T. (2016) "We be jammin': an update on pectin biosynthesis, trafficking and dynamics", *Journal of experimental botany*, 67(2), pp. 495-502.
- Aspinall, G.O. (1980) "Chemistry of cell wall polysaccharides" en Preiss, J (ed.) *The biochemistry of plants, a comprehensive treatise* Vol 3, Nueva York: Academic press, pp. 473-500.
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A.S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Höfte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J. y Williamson, R.E. (1998) "Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*" *Science* 279(5351), pp.717-720.
- Barcelo, A.R. (1997) "Lignification in plant cell walls", *International review of cytology*, 176, pp. 87-132.
- Ben-Tov D, Idan-Molakandov A, Hugger A, Ben-Shlush, I., Günl, M., Yang, B., Usadel, B. y Harpaz-Saad, S. (2018) "The role of COBRA-LIKE 2 function, as part of the complex network of interacting pathways regulating *Arabidopsis* seed mucilage polysaccharide matrix organization", *The Plant journal for cell and molecular biology*, 94(3), pp. 497-512.
- Bethke, G., Thao, A., Xiong, G., Li, B., Soltis, N.E., Haysugai, N.m Hillmer, R.A., Katagiri, F., Kliebenstein, D.J., Pauly, M. y Glazebrook, J. (2016) "Pectin biosynthesis is critical for cell wall integrity and immunity in *Arabidopsis thaliana*", *Plant cell*, 28(2), pp. 537-556.
- Bidhendi, A.J. y Geitmann, A. (2015) "Relating the mechanics of the primary plant cell Wall to morphogenesis", *Journal of experimental botany*, 67(2) pp. 449-461.
- Boerjan, W., Ralph, J. y Baucher, M. (2003) "Lignin biosynthesis" *Annual review of plant biology*, 54, pp. 519-546.
- Bonawitz, N.D. y Chapple, C. (2010) "The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype", *Annual review of genetics*, 44, pp. 337-363.
- Brown, D.M., Zeef, L.A., Ellis, J., Goodacre, R. y Turner, S.R. (2005) "Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics" *Plant cell*, 17(8), pp. 2281-2295.
- Caffall, K.H. y Mohnen, D. (2009) "The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides", *Carbohydrate research*, 344(14), pp. 1879-1900.
- Caño-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M. y Bevan, M. (2003) "Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana*", *The plant journal for cell and molecular biology*, 34(3), pp. 351-362.
- Carpita NC, Ralph J, McCann MC (2015) "The cell wall", en Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2 ed. Rockville: American society of plant biologists, pp. 45-110.
- Carpita, N.C. (1996) "Structure and biogenesis of the cell walls of grasses", *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 47, pp. 445-476.

- Carpita, N.C. y McCann, M.C. (2010) “The maize mixed-linkage (1→3) (1→4)-β-D-Glucan polysaccharide is synthesized at the Golgi membrane”, *Plant physiology*, 153(3), pp. 1362–1371.
- Corio-Costet, M.F., Agnese, D.M. y Scalla, R. (1991) “Effects of isoxaben on sensitive and tolerant plant cell cultures: I. Metabolic fate of isoxaben”, *Pesticide biochemistry and physiology*, 40(3), pp. 246-254.
- Cosgrove, D.J. (2005) “Growth of the plant cell wall”, *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), pp.850–861.
- De Castro, M., Miller, J.G., Acebes, J.L., Encina, A., Garcia-Angulo, P. y Fry, S.C. (2015) “The biosynthesis and wall-binding of hemicelluloses in cellulose-deficient maize cells: an example of metabolic plasticity”, *Journal of integrative plant biology*, 57(4), pp. 373–387.
- DeBolt, S., Gutierrez, R., Ehrhardt, D.W. y Somerville, C. (2007) “Nonmotile cellulose synthase subunits repeatedly accumulate within localized regions at the plasma membrane in *Arabidopsis* hypocotyl cells following 2,6-dichlorobenzonitrile treatment”, *Plant physiology*, 145(2), pp. 334–338.
- Delmer, D.P. (1999) “Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study”, *Annual review plant physiology and plant molecular biology*, 50, pp. 245–276.
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E.F., Jouy, H. y Pochylova, Z. (2007) “Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*”, *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 104(39), pp. 15572–15577.
- Desprez, T., Vernhettes, S., Fagard, M., Refregier, G., Desnos, T., Aletti, E., Py, N., Pelletier, S. y Höfte, H. (2002) “Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6”, *Plant physiology*, 128(2), pp. 482–490.
- Díaz-Cacho, P., Moral, R., Encina, A., Acebes, J.L. y Alvarez, J.M. (1999) “Cell wall modifications in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures tolerant to isoxaben”, *Physiologia plantarum*, 107, pp. 54-59.
- Dische, Z. (1962) “Color reactions of carbohydrates”, en: Whistler, R.L., y Wolfrom, R.L., (eds.), *Methods in carbohydrate chemistry*, New York: Academic Press, pp. 475-514.
- Driouich, A., Follet-Gueye, M.L., Bernard, S., Kousar, S., Chevalier, L., Vitré-Gibouin, M. y Lerouxel, O. (2012) “Golgi-mediated synthesis and secretion of matrix polysaccharides of the primary cell wall of higher plants”, *Frontiers in plant science*, 3, p. 79.
- Duval, I., Brochu, V., Simard, M., Beaulieu, C. y Beaudoin, N. (2005) “Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells”, *Planta*, 222(5), pp. 820-831.
- Encina, A., Sevillano, J.M., Acebes, J.L. y Alvarez, J.M. (2002) “Cell wall modifications of bean (*Phaseolus vulgaris*) cell suspensions during habituation and dehabituation to dichlobenil”, *Physiologia plantarum*, 114(2), pp. 182–191.
- Encina, A.E., Moral, R.M., Acebes, J.L., Álvarez, J.M. (2001) “Characterization of cell walls in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures tolerant to dichlobenil”, *Plant science*, 160(2), 331–339.
- Faik, A. (2010) “Xylan biosynthesis: news from the grass”, *Plant physiology*, 153(2), pp. 396-402.
- Fornale, S., Rencoret, J., Garcia-Calvo, L., Encina, A., Rigau, J., Gutierrez, A., Del Río, J.C. y Caparroz-Ruiz, D. (2017) “Changes in cell wall polymers and degradability in maize mutants lacking 3'- and 5'-O-methyltransferases involved in lignin biosynthesis”, *Plant cell physiology*, 58(2), pp. 240–255.
- Fry, S.C. (1986) “Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms”, *Annual review of plant physiology*, 37, pp. 165-186.
- Fry, S.C., Willis, S.C. y Paterson, A.E.J. (2000) “Intracellular and wall localized formation of arabinoxylanbound diferulates and larger ferulate coupling products in maize cell suspension cultures”, *Planta*, 211(5) pp. 679-692.

- García-Angulo, P., Alonso-Simón, A., Mérida, H., Encina, A., Acebes, J.L y Álvarez, J.M. (2009) “High peroxidase activity and stable changes in the cell wall are related to dichlobenil tolerance”, *Plant physiology*, 166(12), pp. 1229-1240.
- García-Angulo, P., Willats, W.G.T., Encina, A., Alonso-Simón, A., Álvarez, J.M. y Acebes, J.L. (2006) “Immunocytochemical characterization of the cell walls of bean cell suspensions during habituation and dehabituation to dichlobenil”, *Physiol plantarum*, 127(2), pp. 87–99.
- Gardiner, J.C., Taylor, N.G., and Turner, S.R. (2003). “Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem”, *Plant cell* 15(8), pp. 1740–1748.
- Grabber, J.H., Ralph, J. y Hatfield, R.D. (1998) “Severe inhibition of maize wall degradation by synthetic lignins formed with coniferylaldehyde”, *Science of food and agriculture*, 78(1), pp. 81–87.
- Harris, P.J. y Hartley, R.D. (1980) “Phenolic constituents of the cell walls of monocotyledons”, *Biochemical systematics and ecology*, 8(2), pp. 153–160.
- Hatfield, R., Ralph, J. y Grabber, J.H. (2008) “A potential role for sinapyl *p*-coumarate as a radical transfer mechanism in grass lignin formation”, *Planta*, 228(6), pp. 919–928.
- Hatfield, R.D. y Chaptman, A.K. (2009) “Comparing corn types for differences in cell wall characteristics and *p*-coumaroylation of lignin”, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10):4243-4249.
- Hatfield, R.D., Rancour, D.M. y Marita, J.M. (2017) “Grass cell walls: A story of cross linking”, *Frontiers in plant science*, 7, p. 2056.
- Heim, D.R., Roberts, J.L., Pike, P.D. y Larrinua, I.M. (1989) “Mutation of a Locus of *Arabidopsis thaliana* Confers Resistance to the Herbicide Isoxaben”, *Plant physiology*, 90(1), pp.146-150.
- Ikegawa, T., Mayama, S., Nakayashiki, H. y Kato, H. (1996) “Acumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* subsp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes”, *Physiological and molecular plant pathology*, 48(4), pp. 245-256.
- Ishii, T. (1997) “Structure and functions of feruloylated polysaccharides” *Plant science*, 127(2), pp. 111– 127.
- Ivakov, A. y Persson, S. (2013) “Plant cell shape; modulators and measurements”, *Frontiers in plant science*, 4, p. 439.
- Jacquet, G., Pollet, B., Lapierre, C., Mhandi, F. y Rolando, C. (1995) “New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws”, *Journal of agricultural food chemistry*, 43(10), pp. 2746-2751.
- Jarvis, M.C. (2018) “Structure of native cellulose microfibrils, the starting point for nanocellulose manufacture”, *Philosophical transactions of the royal society a mathematical physical and engineering sciences*, 376(2112), 20170045.
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., Ebringerová, A. (2000) “FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses”, *Carbohydrate polymers*, 43(2), pp. 195–203.
- Kärkönen, A. y Koutaniemi, S. (2010) “Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures”, *Journal of integrative plant biology*, 52(2), pp. 176–185.
- Kumar, M. y Turner, S. (2015) “Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms”, *Phytochemistry*, 112, p. 91.
- Kumar, M., Atanassov, I. y Turner, S. (2017) “Functional analysis of Cellulose Synthase (CESA) protein class specificity”, *Plant physiology*, 173(2), pp. 970–983.
- Largo Gosens, 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.
- Largo-Gosens, A., Hernández-Altamirano, M., García-Calvo, L., Alonso-Simón, A., Álvarez, J., Acebes, J.L. (2014) “Fourier transform mid infrared spectroscopy applications for monitoring the structural plasticity of plant cell walls”, *Frontiers in plant science*, 5, p. 303.

- Lee, S.J., Saravanan, R.S., Damasceno, C.M.B., Yamane, H., Kim, B.D. y Rose, J.K.C. (2004) "Digging deeper into the plant cell wall proteome", *Plant physiology and biochemistry*, 42(12), pp. 979–988.
- Lefebvre, A., Maizonnier, D., Gaudry, J.C., Clair, D. y Scalla, R. (1987) "Some effects of the herbicide EL-107 on cellular growth and metabolism" *Weed research*, 27(2), pp. 125-134.
- Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H. y Keegstra, K. (2006) "Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides ---- a complex process", *Current opinión in plant biology*, 9(6), pp. 621–630.
- Li, M., Pu, Y., Yoo, C.G. y Ragauskas, A.J. (2016) "The occurrence of triclin and its derivatives in plants", *Green chemistry*, 18(6), pp. 1439–1454.
- Mansoori, N., Timmers, J., Desprez, T., Kamei, C.L., Dees, D.C., Vincken, J.P., Visser, R.G., Höfte, H., Vernhettes, S. y Trindade, L.M. (2014) "KORRIGAN1 interacts specifically with integral components of the cellulose synthase machinery", *Plos one*, 10(10): e0140411.
- Marowa, P., Ding, A. y Kong, Y. (2016) "Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement", *Plant cell reports*, 35(5), pp. 949–965.
- McFarlane, H.E., Doring, A. y Persson, S. (2014) "The cell biology of cellulose synthesis", *Annual review of plant biology*, 65(1), pp. 69–94.
- Meents, M.J., Watanabe, Y., Samuels, A.L. (2018) "The cell biology of secondary cell wall biosynthesis", *Annals of botany*, 121(6), pp. 1107–1125.
- Mélida, H., Álvarez, J., Acebes, J.L., Encina, A. y Fry, S.C. (2011) "Changes in cinnamic acid derivatives associated with the habituation of maize cells to dichlobenil", *Molecular plant*, 4(5), pp. 869–878.
- Mélida, H., García-Angulo, P., Alonso-Simón, A., Encina, A., Álvarez, J.M. y Acebes, J.L. (2009) "Novel type II cell wall architecture in dichlobenil habituated maize calluses", *Planta* 229(3), pp. 617– 631.
- Mélida, H., Largo-Gosens, A., Novo-Uzal, E., Santiago, R., Pomar, F., García P., García-Angulo, P., Acebes, J.L., Álvarez, J. y Encina, A. (2015) "Ectopic lignification in primary cellulose-deficient cell walls of maize cell suspension cultures", *Journal of integrative plant biology*, 57(4), pp. 357–372.
- Mendu, V., Griffiths, J.S., Persson, S., Stork, J., Downie, A.B., Voiniciuc, C., Haughn, G.W. y Debolt, S. (2011) "Subfunctionalization of cellulose synthases in seed coat epidermal cells mediates secondary radial wall synthesis and mucilage attachment", *Plant physiology*, 157(1), pp. 441-453.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W. y Molina, A. (2014) "The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens", *Frontiers in plant science*, 5, p. 358.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., Viana, J.O.F., Dornelas, M.C. y Mazzafera, P. (2010) "Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants", *Journal of integrative plant biology*, 52(4), pp. 360–376.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures", *Physiology plantarum*, 15, pp. 473-497.
- Nishiyama, Y. (2009) "Structure and properties of the cellulose microfibril", *Journal of wood science*, 55, pp. 241–249.
- Novo-Uzal E., Gomez-Ros, L.V., Hernandez, J.A., Pedreno, M.A., Cuello, J. y Ros-Barcelo, A. (2009) "Analysis of the soluble cell wall proteome of gymnosperms", *Plant physiology*, 166(8), pp. 831– 843.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2020) [Sitio web oficial]. Disponible en: <http://faostat.fao.org> (Accedido: 6 de mayo de 2020).
- Paredez, A.R., Persson, S., Ehrhardt, D.W. y Somerville, C.R. (2008) "Genetic evidence that cellulose synthase activity influences microtubule cortical array organization", *Plant physiology*, 147(4), pp. 1723-1734.
- Paredez, A.R., Somerville, C.R. y Ehrhardt, D.W. (2006) "Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules", *Science*, 312(5779), pp. 1491–1495.

- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A. y Xiong, G. (2013) "Hemicellulose biosynthesis", *Planta*, 238(4), pp. 627–642.
- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P. y Delmer, D. (2002) "Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants", *Science*, 295(5552), pp. 147–150.
- Peña, M.J., Kulkarni, A.R., Backe, J., Boyd, M., O'Neill, M.A. y York, W.S. (2016) "Structural diversity of xylans in the cell walls of monocots", *Planta*, 244(3), pp. 589–606.
- Persson, S., Caffall, K.H., Freshour, G., Hilley, M.T., Bauer, S., Poindexter, P., Hahn, M.G., Mohnen, D. y Somerville, C. (2007) "The Arabidopsis irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity", *Plant cell*, 19(1), pp. 237-255.
- Piston, F., Uauy, C., Fu, L., Langston, J., Labavitch, J. y Dubcovsky, J. (2010) "Down-regulation of four putative arabinoxylan feruloyl-transferase genes from family PF02458 reduces ester-linked ferulate content in rice cell walls" *Planta*, 231(3), pp. 677-91.
- Pomar, F., Merino, F. y Barcelo, A.R. (2002) "O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction.", *Protoplasma*, 220(1-2), pp. 17–28.
- Quideau, S. y Ralph, J. (1997) "Lignin–ferulate cross-links in grasses. Part 4.1–3 Incorporation of 5–5-coupled dehydrodiferulate into synthetic lignin", *Journal of the chemical society-perkin transactions 1*, 16(16), pp. 2351-2358.
- Ralph, J., Grabber, J.H. y Hatfield, R.D. (1995) "Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins", *Carbohydrate research*, 275(1), pp. 167–178.
- Rose, J.K.C., Braam, J., Fry, S.C. y Nishitani, K. (2002) "The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature", *Plant cell physiology*, 43(12), pp. 1421–1435.
- Roudier, F., Fernandez, A.G., Fujita, M., Himmelspach, R., Borner, G.H., Schindelman, G., Song, S., Baskin, T.I., Dupree, P., Wasteneys, G.O. y Benfey, P. (2005) "COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation", *Plant Cell*, 17(6), pp. 1749-1763.
- Sattler, S.E. y Funnell-Harris, D.L. (2013) "Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens?", *Frontiers in plant science*, 4, p. 70.
- Saxena, I.M., Brown, R.M. (2000) "Cellulose synthases and related enzymes", *Current opinion in plant biology*, 3(6), pp. 523–531.
- Schneider, R. y Persson, S. (2015) "Another brick on the wall", *Science*, 350(6257), pp. 156-157.
- Shedletzky, E., Shmuel, M., Delmer, D.P. y Lamport, D.T. (1990) "Adaptation and growth of tomato cells on the herbicide 2,6-dichlorobenzonitrile leads to production of unique cell walls virtually lacking a cellulose-xyloglucan network", *Plant physiology*, 94(3), pp. 980–987.
- Somerville, C. (2006) "Cellulose synthesis in higher plants" *Annual review of cell and developmental biology*, 22, pp. 53–78.
- Takahama, U., Oniki, T. y Shimokawa, H. (1996) "A possible mechanism for the oxidation of sinapyl alcohol by peroxidase-dependent reactions in the apoplast: enhancement of the oxidation by hydroxycinnamic acids and components of the apoplast", *Plant and cell physiology*, 37(4), pp. 499–504.
- Taylor, N.G., Howells, R.M., Huttly, A.K., Vichers, H. y Turner, S.R. (2003) "Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis", *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 100(3), pp. 1450–1455.
- Taylor, N.G., Scheible, W.R., Cutler, S., Somerville, C.R. y Turner, S.R. (1999) "The irregular xylem3 locus of Arabidopsis encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis", *Plant cell*, 11(5), pp. 769–780.

- Turner, S. y Kumar, M. (2018) "Cellulose synthase complex organization and cellulose microfibril structure", *Philosophical transactions of the royal society a mathematical physical and engineering sciences*, 376(2112).
- Updegraff, D.M. (1969) "Semimicro determination of cellulose in biological materials", *Analytical biochemistry*, 32(3), pp. 420-424.
- Vain T, Crowell EF, Timpano H., Biot, E., Desprez, T., Mansoori, N., Trindade, L.M., Pagant, S., Robert, S., Höfte, H., Gonneu, M. y Vernhettes, S. (2014) "The Cellulase KORRIGAN Is Part of the Cellulose Synthase Complex", *Plant physiology*, 165(4), pp.1521-1532.
- Vandavasi, V.G., Putnam, D.K., Zhang, Q., Petridis, L., Heller, W.T., Nixon, B.T., Haigler, C.H., Kalluri, U., Coates, L., Langan, P., Smith, J.C., Meiler, J. y O'Neill, H. (2016) "A Structural study of CESA1 catalytic domain of arabidopsis cellulose synthesis complex: evidence for CESA trimers", *Plant physiology*, 170(1), pp. 123–135.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. y Boerjan, W. (2010) "Lignin biosynthesis and structure", *Plant physiology*, 153(3), pp. 895–905.
- Verhertbruggen, Y. y Knox, J.P. (2006) "Pectic polysaccharides and expanding cell walls. The Expanding Cell" en Verbelen, J.P. y Vissenberg, K. (eds.), *Plant cell monographs*, Berlin: Springer-Verlag, pp. 139–158.
- Wang, Q.Q., Zhu, J.Y., Gleisner, R., Kuster, T.A., Baxa, U. y McNeil, S.E. (2012) "Morphological development of cellulose fibrils of a bleached eucalyptus pulp by mechanical fibrillation", *Cellulose*, 19, pp. 1631–1643.
- Wolf, S. y Greiner, S. (2012) "Growth control by cell wall pectins", *Protoplasma*, 249(2), pp. 169-175.
- Yamada, T., Matsuda, F., Kasai, K., Fukuoka, S., Kitamura, K., Tozawa, Y., Miyagawa, H. y Wakasa, K. (2008) "Mutation of a rice gene encoding a phenylalanine biosynthetic enzyme results in accumulation of phenylalanine and tryptophan", *Plant cell*, 20(5), pp. 1316–1329.
- Zhao, Q. (2016) "Lignification: flexibility, biosynthesis and regulation", *Trends in plant science*, 21(8), pp. 713–721.