



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EFFECTOS DEL ISOXABEN SOBRE PLÁNTULAS Y
CULTIVOS CELULARES DE MAÍZ: CAMBIOS EN
LA PARED CELULAR.**

**EFFECTS OF ISOXABEN ON MAIZE SEEDLINGS
AND CELL CULTURES: CHANGES IN THE CELL
WALL.**

Alba López Losada

D. Jesús Miguel Álvarez Fernández

D. Antonio Esteban Encina García

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Julio, 2022



Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Pared celular.....	1
1.1.1. Celulosa.....	2
1.1.2. Hemicelulosas.....	3
1.1.3. Pectinas.....	3
1.1.4. Proteínas estructurales.....	3
1.1.5. Lignina.....	4
1.1.6. Arquitectura general de la pared celular primaria.....	4
1.1.7. Biosíntesis de celulosa.....	5
1.1.8. Plasticidad de la pared celular.....	7
1.2. Inhibidores de la biosíntesis de celulosa.....	8
1.2.1. Tipos de inhibidores.....	8
1.2.2. Isoxaben.....	9
1.3. Cultivos celulares. Uso en la habituación a CBIs.....	10
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. Material vegetal.....	11
3.1.1. Germinación de semillas.....	11
3.1.2. Cultivo “in vitro”.....	12
3.1.3. Determinación de los pesos fresco y seco.....	12
3.2. Análisis de la pared celular.....	13
3.2.1. Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR).....	13
3.2.2. Valoración de celulosa.....	13
3.2.3. Tinción de lignina por floroglucinol.....	14
3.2.4. Espectroscopía FTIR.....	14
3.2.5. Fraccionamiento de la pared celular.....	14
3.2.6. Análisis de azúcares totales.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5. CONCLUSIONES	24
6. REFERENCIAS	25



universidad
de león



Resumen

El objetivo principal del trabajo es la caracterización de la toxicidad del isoxaben, inhibidor de la biosíntesis de celulosa en maíz, especie con pared primaria de tipo II. Semillas y callos fueron expuestos a un rango de concentraciones de isoxaben entre 0 y 200 μM para plántulas y entre 0 y 10 nM para callos. Se determinaron las alteraciones morfológicas en plántulas explicadas por la interacción de este inhibidor con el complejo enzimático celulosa sintasa. En callos se obtuvieron curvas dosis-respuesta para la ganancia de peso, obteniéndose unos valores de I_{50} de 1 nM para ganancia de peso seco y 10 nM para ganancia de peso fresco. Se aislaron y fraccionaron paredes celulares de callos expuestos a isoxaben 1 nM y 20 nM y se analizaron las diferentes fracciones de polisacáridos. El contenido de celulosa se redujo un 20% y las hemicelulosas fuertemente unidas a la pared celular aumentaron un 40%. La espectroscopia FTIR también detectó la reducción del contenido de celulosa. El isoxaben estimula la lignificación ectópica en la pared celular primaria procedente de células de la raíz de plántulas en una zona coincidente con el meristemo radicular. Sin embargo, la lignificación ectópica no fue observada en callos debido a la diferente sensibilidad de ambos materiales al isoxaben. El trabajo realizado es un inicio para la obtención de callos de maíz habituados a altas concentraciones de isoxaben, material que resulta idóneo para estudiar la flexibilidad estructural de la pared celular primaria.

Palabras clave

Celulosa, cultivos celulares, espectroscopia FTIR, isoxaben, maíz, pared celular.

Abstract

The main objective of this work is the characterization of the isoxaben toxicity, inhibitor of the cellulose biosynthesis in maize, a kind of primary wall type II. Seeds and calluses the maize were exposed to a concentration range of isoxaben between 0 and 200 μM for seedlings and between 0 and 10 nM for calluses. Were determined morphologic alterations in seedlings explained by the interaction of this inhibitor with the enzyme complex cellulose synthase. The maize calluses, dose-response curves were obtained for weight gain, obtaining I_{50} values of 1 nM for dry weight gain and 10 nM for fresh weight gain. Cell walls of calluses exposed to isoxaben 1 nM and 20 nM were isolated and fractionated and the different fractions of polysaccharides were analyzed. The cellulose content decreased in 20% and the tightly bound hemicelluloses to the cellular walls increased in 40%. The FTIR spectroscopy also detected the reduction of the cellulose content. The isoxaben stimulates the ectopic lignification in the primary cellular wall from root cells of seeding in an area coinciding with the root meristem. However the ectopic lignification was not observed in the calluses due to a different sensibility of both materials to the isoxaben. The work carried out is a first step to obtaining maize calluses habituated to high concentrations of isoxaben that will allow study the structural flexibility of the primary cellular wall.

Key words

Cellulose, cell cultures, FTIR spectroscopy, isoxaben, maize, cell wall.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Pared celular

La pared celular es una estructura semirrígida, con un espesor entre 0,1-1 μM , que rodea al protoplasto de la célula vegetal. Su composición varía dependiendo principalmente del grupo taxonómico, del estado de desarrollo del órgano y del tipo de tejido. De forma general está constituida, principalmente, por polisacáridos (alrededor del 90% del peso seco) con pequeñas cantidades de glicoproteínas y fenoles (10% restante de la pared).

La célula vegetal forma su pared celular en una serie de capas. La primera, formada durante la división celular, y por tanto compartida por las dos células vecinas, recibe el nombre de lámina media. Esta capa, frecuentemente muy delgada y engrosada ligeramente en las esquinas, está compuesta principalmente por polisacáridos de naturaleza péctica y se encuentra en el centro de la doble pared formada por dos células vecinas, siendo responsable de mantener la cohesión entre células adyacentes (Aspinall, 1980). Una vez que se completa la placa celular, las células hijas forman entre la lámina media y la membrana plasmática la pared celular primaria. Esta segunda capa, mucho más organizada que la lámina media (Albersheim *et al.*, 1987) sigue formándose durante todo el crecimiento celular. Cuando el crecimiento se detiene, la acumulación de nuevos materiales y los cambios sufridos durante el mismo hacen de esta pared una estructura rígida. Las paredes celulares primarias son relativamente porosas, con tamaño de poro que varía entre 3,5-5,2 nm y permite el paso de sacarosa, sustancias reguladoras del crecimiento, agua, y pequeñas proteínas y polisacáridos. Muchos tipos celulares presentan únicamente las dos capas anteriores. Sin embargo, las células que se especializan una vez finalizado el crecimiento, depositan nuevas capas en la cara interna de la pared primaria hasta formar lo que se conoce como pared celular secundaria. Esta pared es más gruesa y más rígida que la pared celular primaria (Sharp *et al.*, 1984) y su composición y estructura varía dependiendo del tejido.

La pared celular no es una estructura inerte sino que cumple importantes funciones durante el desarrollo de una planta. Está implicada en los procesos de reconocimiento celular, limita el intercambio de metabolitos entre el protoplasto y el medio externo, condiciona la forma de la célula, la velocidad y dirección del crecimiento, y es fuente potencial de moléculas con actividad reguladora del crecimiento (oligosacarinas). Constituye también un



lugar de metabolismo de proteínas y carbohidratos y, por último, al estar unida a otras paredes adyacentes se sincronizan y tienen una expansión coordinada (Somerville *et al.*, 2004; Daras *et al.*, 2021). El conjunto de todas las paredes celulares de una planta proporciona un almacén capaz de sustituir la función de soporte que otorga el esqueleto a algunos animales.

Tanto la pared celular primaria como la secundaria pueden considerarse como una estructura bifásica, depositada en lamelas, y compuesta por un esqueleto rígido de microfibrillas de celulosa embebidas dentro en una matriz a modo de gel (Fry, 1988). En la pared celular primaria, esta matriz está integrada por hemicelulosas, pectinas, glicoproteínas y fenoles. Aunque las características de las microfibrillas de celulosa no varían mucho en función del grupo de plantas superiores considerado (gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas), las de la fase matricial sí presentan diferencias importantes en cuanto a composición y estructura. Los polisacáridos son los componentes principales de la pared celular (90%) y su estructura y biosíntesis se han revisado frecuentemente (Atmodjo *et al.*, 2013; Rennie y Scheller, 2014; Liepman *et al.*, 2018; Tucker *et al.*, 2018).

1.1.1. Celulosa

La celulosa es un polímero de glucosa, es sintetizado como componente principal en las paredes de células vegetales. La cantidad de celulosa en una pared celular primaria es muy variable, estando generalmente en una proporción alrededor del 50% del peso seco de la pared celular primaria.

La celulosa se encuentra tanto en paredes celulares primarias como secundarias y es el principal y más característico componente de la pared celular. Constituye entre el 40% y el 60% de la biomasa total de las plantas y es el compuesto orgánico más abundante de la Tierra. Esta abundancia es fruto tanto de su gran estabilidad química que confiere una enorme resistencia a la degradación como de la abundancia de biomasa vegetal. Su estructura molecular es la de un polisacárido formado por una agrupación de cadenas β -(1,4)-glucano sin sustituciones. Estos glucanos tienen una estructura espacial plana, sin puntos de inflexión, gracias a la cual ofrecen una gran superficie para poder interactuar entre sí, a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, formando una estructura cristalina microfibrilar, muy empaquetada, con la que se deposita en la pared celular. Esta estructura molecular es responsable de la gran resistencia mecánica de la pared celular (siempre en el sentido longitudinal de las microfibrillas) y, por tanto, de la dirección que tome la expansión



celular, que siempre será perpendicular a la orientación con que se han depositado las microfibrillas de celulosa.

Durante muchos años, en base a su compatibilidad con los modelos estructurales de la celulosa sintasa, se asumió que cada microfibrilla de celulosa de la pared celular primaria estaba formada por 32 cadenas β -(1,4)-glucano (Vandavasi *et al.*, 2015). Sin embargo, los últimos estudios con técnicas de difracción de rayos X han permitido proponer entre 18 y 24 cadenas β -(1,4)-glucano (Purushotham *et al.*, 2020).

1.1.2. Hemicelulosas

Las hemicelulosas son un grupo de polisacáridos que enlazan las microfibrillas de celulosa. Es un grupo muy heterogéneo de compuestos con esqueletos centrales de β -(1-4) glucosa, manosa o xilosa y sustituciones de xilosa, galactosa, arabinosa. Las principales hemicelulosas son xiloglucanos, mananos, xilanos, arabinoxilanos, glucuronoxilanos, glucuronoarabinoxilanos, glucomananos, galactomananos, galactoglucomananos y β -(1,3-1,4)-glucanos (glucano mixto) (Ebringerová, 2005; Scheller y Ulvskov, 2010). En las paredes celulares de dicotiledóneas, la hemicelulosa principal es el xiloglucano, mientras que en monocotiledóneas abundan los arabinoxilanos y el glucano mixto. En maíz, especie con la que se ha hecho este trabajo, las principales hemicelulosas son los arabinoxilanos.

1.1.3. Pectinas

Las pectinas son posiblemente los polisacáridos más complejos y heterogéneos de la pared celular (Harholt *et al.*, 2010). Se localizan predominantemente en la pared celular primaria y lámina media y tienen funciones en la expansión, resistencia, porosidad, adhesión y señalización intercelular. Se trata de polímeros de ácido galacturónico que incluyen, entre otros, homogalacturonanos y ramnogalacturonanos I y II (Albersheim *et al.*, 1996; Mohnen, 2008). Sin embargo, las pectinas en maíz suelen ser minoritarias en monocotiledóneas.

1.1.4. Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales de la pared celular varían tanto por su contenido de aminoácidos (inusualmente rico en uno o dos aminoácidos y con dominios muy repetitivos) como por su nivel de N- u O-glicosilación (Rose y Lee, 2010). Las más abundantes y estudiadas son las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) o extensinas, las proteínas arabinogalactano (AGPs), las proteínas ricas en glicina (GRPs), las proteínas ricas en prolina



(PRPs) y proteínas quiméricas (resultado de la fusión de los productos de dos o más genes) con dominios tipo extensinas. La abundancia de estas proteínas difiere según el tipo de célula, de modo que cada proteína puede tener funciones específicas de un tipo celular concreto.

1.1.5. *Lignina*

La lignina es el segundo polímero más abundante de nuestro planeta detrás de la celulosa; alrededor del 30% del carbono orgánico de la biosfera está en forma de lignina (Ralph *et al.*, 2004). La lignina, que puede representar del 10% al 24% del peso de la biomasa de la planta, es un derivado aromático fenilpropanoide que consta de tres monómeros hidroxicinámicos, denominados monolignoles, unidos entre sí por enlaces covalentes, y que difieren en su grado de metoxidación. Cuando estos monolignoles se incorporan a los polímeros de lignina, se convierten respectivamente en tres tipos de unidades fenilpropanoide denominadas: H (*p*-hidroxifenilo), G (guaiacilo) y S (siringilo). Estas unidades se unen entre sí durante el proceso de lignificación, gracias a reacciones de acoplamiento de radicales.

La lignina es frecuente en paredes celulares secundarias, como son las paredes de las células conductoras del xilema, en donde les confiere una gran resistencia mecánica que permite la existencia de las elevadas tensiones necesarias para que se lleve a cabo el transporte por este tejido conductor. Las paredes celulares primarias no contienen generalmente lignina. Sin embargo, algunas células con pared celular primaria pueden formar lignina en condiciones de estrés, denominándose a este proceso lignificación ectópica. La lignina ha sido objeto de varias revisiones en los últimos años (Liu *et al.*, 2018).

1.1.6. *Arquitectura general de la pared celular primaria*

A lo largo de los años se han propuesto diferentes modelos que explican la forma en que los componentes citados anteriormente se unen para formar la estructura de la pared celular (Keegstra *et al.*, 1973; Carpita y Gibeaut, 1993; Somerville *et al.*, 2004). Es ampliamente aceptado que los polisacáridos hemicelulósicos se unen fuertemente a las microfibrillas de celulosa a través de puentes de hidrógeno, y la mayoría de los modelos han incorporado esta interacción como una característica importante de la arquitectura de la pared celular. Se sabe menos de la forma con que los polisacáridos pécticos interactúan con otros componentes de la pared celular, aunque existe un amplio reconocimiento de su importancia en las paredes celulares primarias, donde son más abundantes. La naturaleza dinámica de las paredes



celulares de las plantas es una característica importante que se echa en falta en la mayoría de los modelos.

En general, atendiendo a su arquitectura se distinguen dos tipos de pared celular primaria denominados tipo I y tipo II (Carpita, 1996). Las paredes celulares tipo I se encuentran en plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas no commelinoides y gimnospermas. En estas paredes celulares, los polisacáridos principales son la celulosa, las pectinas y los xiloglucanos. Las paredes celulares tipo II son propias de monocotiledóneas commelinoides, incluidas las gramíneas (Carpita, 1996). Las paredes celulares tipo II contienen, además de celulosa, muy pocas pectinas, y suelen tener variadas hemicelulosas: glucano mixto (β -(1,3-1,4)-glucano) y grandes cantidades de xilanos que normalmente se unen a unidades de arabinosa (Carpita y Gibeaut, 1993). Estas sustituciones de arabinosa pueden esterificarse con hidroxycinamatos (ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico) (Rennie y Scheller, 2014; Hatfield *et al.*, 2017).

La pared celular primaria tiene una gran plasticidad composicional y estructural que se pone de manifiesto en algunos mutantes con paredes celulares modificadas o frente a muy diferentes condiciones de estrés. Entre estas últimas se incluye la modificación de la pared celular que tienen algunas células como consecuencia de la habituación de cultivos celulares, callos y suspensiones de células, a algunos compuestos químicos, concretamente inhibidores de la biosíntesis de celulosa. La caracterización de paredes celulares modificadas ha permitido profundizar en el conocimiento de la composición, dinámica y fisiología de la pared celular.

1.1.7. Biosíntesis de celulosa

La formación de las microfibrillas de celulosa se divide en tres pasos: 1) iniciación de la cadena β -(1,4)-glucano, que tiene lugar probablemente a partir de un resto β -glucosido de sitosterol de la membrana plasmática (Peng *et al.*, 2002); 2) alargamiento de la cadena β -(1,4)-glucano por polimerización de sucesivas unidades de glucosa, utilizando UDP-glucosa como molécula donadora de glucosa; 3) cristalización de las cadenas β -(1,4)-glucano en microfibrillas y deposición de estas en la pared celular (Peng *et al.*, 2002). Las microfibrillas de celulosa se sintetizan por complejos móviles de la enzima celulosa sintasa (CSC), también localizados en la membrana plasmática, que se visualizan como rosetas simétricas hexaméricas, también llamadas complejos terminales debido a que se encuentran al final de



las microfibrillas de celulosa. El sustrato de la celulosa sintasa, UDP-glucosa, se sintetiza por una invertasa UDP-glucosa-pirofosforilasa citosólica (Barnes y Anderson, 2018). La celulosa sintasa no solo interviene en la polimerización de glucosas sino también en la formación de las microfibrillas, en su deposición de éstas en la pared celular y es responsable de la orientación de las microfibrillas, de la que depende la forma que adopte la célula. Los complejos CSC (complejo celulosa sintasa) están formados por proteínas CESA (subunidades catalíticas de la celulosa sintasa). Cada proteína CESA contiene una región N-terminal citosólica que participa en la oligomerización de las subunidades CESA (Kurek *et al.*, 2002) seguida de dos dominios transmembrana, un “loop” central que contiene el centro de unión del sustrato y las zonas catalíticas, seis dominios transmembrana adicionales (Sethaphong *et al.*, 2013; Slabaugh *et al.*, 2014) y un dominio C-terminal.

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; Endler y Persson, 2011) mientras que CESA4, CESA7, y CESA8 están implicadas en la biosíntesis de celulosa de paredes celulares secundarias (Taylor *et al.*, 2000; Saxena y Brown, 2005; Bosca *et al.*, 2006; Mendu *et al.*, 2011; McFarlane *et al.*, 2014). Las restantes proteínas CESA (CESA2, CESA5, CESA9, y 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). El número de proteínas CESA en una CSC ha sido y sigue siendo objeto de discrepancias.

Además de las proteínas CESA existen otras proteínas accesorias implicadas como componentes integrales de CSC: STELLO (STL) que asiste en el ensamblaje de CSC (Zhang *et al.*, 2016); POM2 y CSII (Cellulose Synthase Interacting protein 1) que interviene en la inserción de CSC en la membrana plasmática; PATROL (PTL) y SHOU intervienen en la exocitosis de CESA (Polko *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018); CC (Companion of cellulose): interviene en la recuperación de los microtúbulos tras un estrés salino (Endler *et al.*, 2015); KORRIGAN, una endo- β -1,4-endoglucanase que actúa en la edición de las microfibrillas de celulosa desenredando las cadenas de glucano recién formadas (Lane *et al.*, 2001; Roudier *et al.*, 2005; Mansoori *et al.*, 2014; Vain *et al.*, 2014) y COBRA que actúa en el ensamblaje de



las microfibrillas de celulosa modulando la cristalinidad y afectando la orientación de las microfibrillas de celulosa (Benfey *et al.*, 1993; Roudier *et al.*, 2005; Ben-Tov *et al.*, 2018).

El mecanismo y la biosíntesis de celulosa presenta hoy en día numerosos aspectos desconocidos y ha sido objeto de numerosas revisiones (Polko *et al.*, 2018; Polko y Kieber, 2019; Allen *et al.*, 2021; Bulmer *et al.*, 2021).

1.1.8. *Plasticidad de la pared celular*

La pared celular primaria tiene una gran plasticidad composicional y estructural que se pone de manifiesto en algunos mutantes con paredes celulares modificadas o frente a muy diferentes condiciones de estrés. Entre estas últimas se incluye la modificación de la pared celular que tienen algunas células como consecuencia de la habituación de cultivos celulares, callos y suspensiones de células, a algunos CBIs (“Cellulose Biosynthesis Inhibitors”). La caracterización de cultivos celulares con paredes celulares modificadas ha permitido profundizar en el conocimiento de la composición, dinámica y fisiología de la pared celular.

Para habitar células a CBIs se empiezan a cultivar células, callos o suspensiones celulares, en concentraciones subletales y se va aumentando la concentración del inhibidor progresivamente. La habituación a CBIs se ha logrado en tomate, tabaco, alubia, *Arabidopsis* y cebada, y a varios CBIs, como isoxaben, quinclorac y taxtomina A (Acebes *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2012; Tateno *et al.*, 2016).

Los cultivos habituados de estas especies manifestaban una serie de características comunes: bajas tasas de crecimiento, células con morfologías irregulares que tendían a crecer en forma de agregados, y paredes celulares más gruesas con bajos contenidos en celulosa que eran compensados por un aumento en otros componentes de la pared: pectinas en las paredes celulares de tipo I y hemicelulosa en las de tipo II (Mélida *et al.*, 2009). Muchos de estos estudios de habituación a CBIs se realizaron utilizando especies con pared celular tipo I, sin que prácticamente existan trabajos en los que se hayan habituado células con paredes tipo II, a excepción de la habituación a diclobenil lograda en células de cebadal (Shedletzky *et al.*, 1992) y maíz (Mélida *et al.*, 2009). El mecanismo de habituación a CBIs descrito, refleja un alto grado de plasticidad composicional y estructural de la pared celular. Las células con paredes celulares modificadas son un buen material para estudiar la repercusión de los cambios que ocurren en la pared sobre la fisiología celular.



Este trabajo constituye un primer paso en la habituación de cultivos celulares de maíz (especie con parad celular tipo II) a concentraciones elevadas (por encima de la correspondiente I_{50}) de isoxaben. Sería la primera vez que se habituaran células de un cereal a este CBI.

1.2. Inhibidores de la biosíntesis de celulosa

1.2.1. Tipos de inhibidores

Los inhibidores de la biosíntesis de la celulosa (CBIs “Cellulose Biosynthesis Inhibitors”) forman un grupo de compuestos, sin relación estructural, que afectan específicamente a la polimerización de la glucosa en β -(1,4)-glucanos o a la formación y deposición de las microfibrillas en las paredes celulares de plantas superiores. Estos compuestos han sido objeto de varias revisiones (Sabba y Vaughn, 1999; Vaughn, 2002; Acebes *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2012; Tateno *et al.*, 2016). Se incluyen en este grupo: diclobenil, clortiamida, isoxaben, flupoxam, oxaziclomefone, triazofenamida; triaziflam; cobtorina (Wakabayashi y Böger, 2004) y Endosidin20 entre otros (Huang *et al.*, 2021). Finalmente, algunos compuestos, como quinclorac y ancimidol, muestran un efecto dual, es decir, actúan como CBIs en algunos casos y muestran un modo de acción adicional en otras circunstancias. La cantidad de información sobre cada uno de estos compuestos es desigual. En este trabajo se utiliza uno de los más conocidos, isoxaben. Otros CBIs se tratan en las revisiones anteriores y algunas publicaciones más recientes (Tateno *et al.*, 2016; Sebastian *et al.*, 2017; Brabham *et al.*, 2018; Larson y McFarlane, 2021).

Muchos de los inhibidores de la biosíntesis de celulosa denominados CBIs se utilizan como herbicidas de preemergencia en el control de malas hierbas. Actualmente tienen una elevada importancia en el ámbito de la agricultura debido a problemáticas de resistencia de malezas a otros herbicidas (Daras *et al.*, 2021).

Se desconocen muchos aspectos del modo de acción de estos inhibidores, concretamente del isoxaben, y frecuentemente se clasifican en función de los efectos observados a nivel celular (Tateno *et al.*, 2016). Se presentan unos criterios de semejanza del modo de acción general que presentan los CBIs, las plántulas expuestas presentan una particularidad sintomatológica de CBI observándose un crecimiento atrofiado y mayor grosor de la zona subapical de los tejidos que se puede expandir rápidamente y donde se presenta la



lignificación ectópica. También es importante remarcar el contenido de celulosa el cual se ve reducido dependiendo de la dosis administrada, inhibiendo la fracción de celulosa que se incorpora a las paredes celulares.

1.2.2. Isoxaben

El Isoxaben (N-3-(1-etil-1-metilpropil)-5-isoxazolin-2,6-dimetoxibenzamida) es, como muchos otros CBIs, un herbicida utilizado en el control de malas hierbas. Es selectivamente fitotóxico, se emplea como herbicida de preemergencia para malezas dicotiledóneas en cultivos de cereales. Impide el crecimiento de las plántulas sin afectar a la germinación. En cultivos celulares el isoxaben es estrechamente activo en comparación con otros CBIs, presentando una I_{50} en el rango nanomolar cuando se utiliza sobre cultivos celulares de alubia y *Arabidopsis* (Desprez *et al.*, 2002; Manfield *et al.*, 2004).

El isoxaben es muy selectivo, inhibiendo específicamente la incorporación de glucosa a la celulosa en plantas sin alterar sus procesos metabólicos, como la fotosíntesis, respiración y biosíntesis de carotenos (Caño-Delgado *et al.*, 2003). La sintomatología del isoxaben es parecida al diclobenil en *Arabidopsis* las plántulas tratadas tienen un fenotipo enano provocado por la inhibición del crecimiento del hipocotilo y raíz (Desprez *et al.*, 2002).

Su modo de acción sigue sin estar totalmente descrito, pero se conoce que actúa en el ensamblaje de las proteínas CESA3 y CESA6 dentro del complejo de la celulosa sintasa, impidiendo la formación del complejo enzimático e imposibilitando su correcto funcionamiento. El efecto sobre las proteínas CESA obstruye el canal para la correcta extrusión de la microfibrilla de celulosa (Desprez *et al.*, 2002; Paredez *et al.*, 2006; Tateno *et al.*, 2016). Como consecuencia se altera la orientación de las microfibrillas de celulosa en la pared celular, que actúa por la interacción de la celulosa sintasa con la red de microtúbulos. Un efecto similar es ejercido por el diclobenil (DCB), otro conocido y bien caracterizado CBI (Gutierrez *et al.*, 2009) y desencadena en la muerte celular programada en suspensiones celulares de *Arabidopsis* también descrita para otros CBIs como la taxtomina A (Duval *et al.*, 2005; Awwad *et al.*, 2019). La pérdida de la orientación de las microfibrillas de celulosa causa un efecto conocido como *cell swelling* (hinchamiento celular) que también aparece en otros CBIs.



1.3. Cultivos celulares. Uso en la habituación a CBIs

El uso de cultivos celulares, callos y suspensiones celulares, ofrece varias ventajas sobre los cultivos tradicionales de plantas completas (Encina *et al.*, 2001, 2002).

- La posibilidad de disponer de un número elevado de células en un espacio reducido.
- Todas las células están homogéneamente expuestas a las mismas condiciones (por ejemplo: concentraciones elevadas de CBIs). Con lo que resulta fácil de controlar y manipular diferentes condiciones.
- Existe la posibilidad de seleccionar líneas con características específicas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A lo largo de la introducción se ha descrito la elevada plasticidad estructural que tiene la pared celular primaria y cómo ésta se pone de manifiesto cuando se estudia la toxicidad, a corto y a largo plazo, de CBIs en cultivos celulares.

La toxicidad a corto plazo se estudia en cultivos celulares que se exponen a concentraciones del inhibidor cercanas a la I_{50} (concentración del inhibidor que presenta el 50% de actividad respecto al material vegetal no tratado); mientras que la toxicidad a largo plazo se caracteriza en cultivos celulares que se habitúan a crecer en concentraciones muy por encima de la correspondiente I_{50} . La habituación a CBIs es un proceso laborioso que consume mucho tiempo y básicamente consiste en ir incubando cultivos celulares con concentraciones crecientes del inhibidor, comenzando con una concentración ligeramente por debajo de la I_{50} . Estos estudios de toxicidad a corto y largo plazo han resultado de gran interés para caracterizar las interacciones entre las principales redes de polímeros de la pared celular primaria.

En el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de León se ha logrado habitar a isoxaben cultivos celulares de alubia (especie con pared celular tipo I) (Díaz-Cacho *et al.*, 1999) y a diclobenil cultivos celulares de maíz (con pared celular tipo II) (Mélida *et al.*, 2009) y alubia (Encina *et al.*, 2001, 2002).

Si bien es desconocido al día de hoy el modo de acción del isoxaben, diversos resultados señalan que actúa de diferente forma a otro CBI mejor caracterizado, como el diclobenil (Desprez *et al.*, 2002; Paredez *et al.*, 2006; DeBolt *et al.*, 2007; Tateno *et al.*, 2016). Todo el trabajo realizado hasta el día de hoy con isoxaben utilizó especies con paredes



celulares del tipo II (Díaz-Cacho *et al.*, 1999; Manfield *et al.*, 2004), sin que se tenga conocimiento del logro de ningún resultado en monocotiledóneas.

Este trabajo estudia la toxicidad a corto plazo del isoxaben, asumiendo que este inhibidor afecta a la composición y estructura de la pared celular. Constituye un primer paso para conseguir la habituación al inhibidor.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo general de este trabajo es la caracterización de la toxicidad del isoxaben a corto plazo en maíz, una especie con pared celular primaria del tipo II. Para conseguirlo se utilizará un amplio rango de concentraciones del inhibidor y se determinarán los efectos anatómicos en plántulas y bioquímicos en cultivos celulares. La consecución de este objetivo se abordará mediante una serie de objetivos parciales:

Objetivo 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 la morfología de las plántulas.

Objetivo 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 cincuenta.

Objetivo 3. Analizar la alteración de la pared celular. Se obtendrán y fraccionarán en diferentes fracciones de polisacáridos paredes celulares de callos de maíz después de haber sido tratados con isoxaben. Se determinarán los azúcares totales en cada fracción y se utilizará espectroscopia infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR). Asimismo, se valorará el contenido de celulosa en la pared celular y se comprobará la posible formación de lignina (lignificación ectópica).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

3.1.1. Germinación de semillas

En este trabajo se utilizan semillas de maíz híbrido de la variedad DK313. Las semillas de maíz fueron previamente esterilizadas mediante un tratamiento con lejía de 30 segundos seguido de sucesivos lavados con etanol al 70% y agua destilada. Lotes de 10 semillas se depositaron en frascos de cristal con 3 discos de papel de filtro tapadas con papel albal y se



autoclavaron (temperatura 121- 134 °C durante 30 min). Se añadieron en el fondo de cada frasco tres discos de papel de filtro en los que se aplicó la correspondiente concentración de isoxaben. Todos los pasos fueron llevados a cabo en condiciones asépticas utilizando una cabina de flujo laminar. Los frascos de cristal fueron sellados con parafilm y se mantuvieron germinando las semillas con isoxaben, durante dos días a 25 °C en oscuridad seguidos de ocho días con luz continua.

Se utilizaron las siguientes concentraciones de isoxaben: 0 µM, 10µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM y 200 µM. El isoxaben fue previamente solubilizado en etanol al 96% a una concentración de 10 µM. Tras el periodo de germinación y crecimiento, se midió la longitud de la radícula, midiendo siempre la raíz más desarrollada, ya que el maíz presenta numerosas raíces secundarias.

3.1.2. Cultivo “*in vitro*”

Los callos de maíz, obtenidos de embriones inmaduros de maíz, son una donación del Dr. S.C. Fry del Institute of Molecular Plant Sciences, de la Universidad de Edinburgo, UK. Los callos se subcultivaron cada 25 - 30 días, colocando 2 piezas por placa Petri, provenientes del mismo callo y de un tamaño similar. El medio utilizado fue MS (Murashige y Skoog, 1962), complementado con 2,4-D 9 µM, sacarosa 20 g.L⁻¹, agar 7 g.L⁻¹ a pH 5,8. Los cultivos se mantuvieron a 25°C y con luz: fotoperiodo 16:8; 3000 lux ≈ 41µmol m⁻² s⁻¹).

El isoxaben fue añadido al medio de los callos. Las concentraciones de isoxaben fueron: 0 (callo control), 0,1µM, 1µM, 0,1 nM, 1 nM y 10 nM. Se determinó el crecimiento de los callos por variación del peso fresco y peso seco a los 30 días de iniciarse el subcultivo.

3.1.3. Determinación de los pesos fresco y seco

Los callos se pesaron antes de iniciar el cultivo ($P_{inicial}$) y después de 30 días de cultivo (P_{final}). Se calculó el incremento relativo de peso fresco (IRP) respecto al peso inicial. Este incremento relativo se expresó en función del peso fresco inicial:

$$IPR = (P_{inicial} - P_{final}) / P_{inicial}$$

El residuo seco del callo se obtuvo después de eliminar el agua en estufa a 50 °C durante el tiempo necesario para mantener constante el peso. El peso del residuo seco fue llamado peso seco (P_{seco}). Se calcula el porcentaje del P_{seco} (% P_{seco}) como la parte del P_{fresco} que corresponde al residuo seco (P_{seco}):



$$\%P_{\text{seco}} = (P_{\text{seco}} \times 100) / P_{\text{fresco}}$$

La constante de inhibición cincuenta (I_{50}), concentración de isoxaben capaz de inhibir el crecimiento de los callos en un 50% en comparación con el callo no tratado con isoxaben, se calculó utilizando la ganancia de peso fresco y peso seco como parámetros inhibidos. Se realizan 3 replicas (experimentos independientes) de cada concentración de isoxaben.

3.2. Análisis de la pared celular

3.2.1. Obtención del residuo insoluble en alcohol (AIR)

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, se secó en una estufa a 60°C, obteniéndose el residuo insoluble en alcohol (AIR). El AIR fue tratado con dimetilsulfóxido y α -amilasa para eliminar 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 °C.

3.2.2. Valoración de celulosa

La valoración de celulosa se realizó por el método Updegraff (Updegraff, 1969). Una muestra de 5 mg de pared celular con 3 ml de ácido acético/ácido nítrico/agua (8:1:2 v/v), se calentó durante 30 minutos a partir de un baño con agua hirviendo. Después de enfriarse, la suspensión derivada se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se lavó secuencialmente el precipitado con 1 ml de agua destilada, y 1 ml de acetona pura y se colocó en la centrifugadora a 4000 rpm otros 15 minutos retirando el sobrenadante. El residuo resultante se mantuvo secando en estufa a 35°C hasta tener un peso constante. Se resuspendió el residuo en 0,2 ml de ácido sulfúrico al 72% (13,51 M) durante 3 horas a temperatura ambiente. Se ajustó la concentración usando ácido sulfúrico a 1 M, agregando 2,5 ml de agua destilada, e hidrolizándose durante 2,5 horas a 110 °C.

Los azúcares liberados durante la hidrólisis de los glucanos con ácido sulfúrico fueron valorados por el método de antrona (Dische, 1962). Consiste en mezclar 1 ml de antrona 0,2% (p/v) en ácido sulfúrico concentrado con 0,5 ml de la muestra. Seguidamente se incubaron las muestras en el baño a partir de agua hirviendo durante 5 minutos y se dejó enfriando para leer su absorbancia a 620 nm.



3.2.3. Tinción de lignina por floroglucinol

La tinción Wisner se realizó tanto en raíces y callos tratados con isoxaben. Se obtuvieron secciones longitudinales de las raíces de cada tratamiento cortándolas con ayuda de un bisturí. Estas secciones de raíz se trataron durante 5 minutos con floroglucinol al 1% (v/w) preparado en etanol al 70%. Se eliminó la solución de tinción por centrifugación y seguidamente se incubó con HCL al 18%.

Para los callos se seleccionaron callos control y callos tratados con concentraciones de isoxaben cercanas a la I_{50} . Para observar las imágenes obtenidas de las distintas muestras se utilizó una lupa Nikon SMZ 1500.

3.2.4. Espectroscopía FTIR

Se utilizó un equipo de espectroscopía Perkin Elmer, con una resolución de $0,4 \text{ cm}^{-1}$, con atenuación del tipo ATR (Attenuated Total Reflection). Se obtuvieron espectros de FTIR de paredes celulares con concentraciones control, y tratados con isoxaben a concentración 1 nM y 20 nM. Se ajustó la línea base para cada espectro, se usó el software de gestión de datos de Perkin Elmer IR.

3.2.5. Fraccionamiento de la pared celular

A partir de 10 mg de pared celular, añadir 2 ml de CDTA (ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético) 0,05 M a pH 6,5 manteniéndose agitando durante 24 horas a 80 rpm y centrifugar a 9000 rpm durante 5 minutos retirando el sobrenadante. Se realizó seguidamente un lavado con agua destilada a partir de 1 ml. Los sobrenadantes y lavados producidos del tratamiento con CDTA será la fracción obtenida de CDTA. Este mismo proceso se repetirá con KOH 0,1 M y KOH 4 M mencionados a continuación.

Al residuo resultante del anterior paso se le añade 2 ml de KOH a 0,1 M con NaBH_4 0,02 M. Dicha mezcla se mantiene agitando durante 24 horas. Después se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos descartando el sobrenadante. Se lleva a cabo un lavado con agua destilada mediante 1 ml, se vuelve a poner a centrifugar y se recoge el sobrenadante que será la fracción obtenida de KOH 0,1 N. De igual manera, el residuo resultante del paso anterior se añade 2 ml de KOH 4 M con NaBH_4 0,02 M, la mezcla obtenida se mantuvo en agitación durante 24 horas. Se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante.



A partir de un lavado con 1 ml de agua destilada, se vuelve a centrifugar y el sobrenadante obtenido será la fracción correspondiente a KOH 4 M.

3.2.6. Análisis de azúcares totales

Se utilizó el método del fenol-sulfúrico a 0,4 ml de muestra se le añadió 0,4 ml de fenol a 5% (v/v) y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Una vez realizado, se incubó a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 490 nm (Dubois *et al.*, 1956). Se obtienen los cálculos extrapolando las, absorbancias a una recta patrón que se origino a partir de la solución de glucosa $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo estudia la toxicidad del herbicida isoxaben en plántulas y en cultivos celulares del maíz. Semillas de maíz fueron puestas a germinar en presencia de un gradiente de concentración de isoxaben entre 0 hasta los 200 μM . En la **figura 1**, se representa el crecimiento de la raíz de plantas a los 10 días de tratamiento con isoxaben, expresado como porcentaje de crecimiento respecto al control, 10 μM de isoxaben estimula el crecimiento de la raíz en un 60% respecto al tamaño de las plantas crecidas en ausencia de isoxaben. Este efecto estimulador en baja concentración de un inhibidor es conocido como hormesis y ha sido previamente descrito en alubia frente a otros conocidos inhibidores de la biosíntesis de celulosa, como diclobenil (García-Angulo *et al.*, 2009) y quinclorac (Largo-Gosens *et al.*, 2014). Generalmente la hormesis en inhibidores de la biosíntesis de celulosa se debe a una actividad del inhibidor diferente de la inhibición de la biosíntesis de celulosa, como es en parte, la atenuación del estrés oxidativo.

En concentraciones mayores, entre 10 y 200 μM , el isoxaben inhibe el crecimiento en longitud de la raíz en plántulas de maíz. El maíz se comporta como una especie menos sensible que las especies dicotiledóneas, ya que la inhibición se produce en un rango de concentraciones mayores, como es el caso de *Arabidopsis* o *Brassica napus*, en las que el crecimiento de la radícula es inhibido por el isoxaben en el rango nanomolar, 1,5 nM (Desprez *et al.*, 2002), 20 nM (Lefebvre *et al.*, 1987) o 4,5 nM (Heim *et al.*, 1989) respectivamente. No se tienen datos del efecto del isoxaben sobre radículas de otras plantas monocotiledóneas, aunque cabe esperar que las especies monocotiledóneas son menos sensibles al isoxaben ya que este compuesto se utiliza tradicionalmente para el control de malas hierbas dicotiledóneas en cultivos de cereales (Brabham *et al.*, 2018).

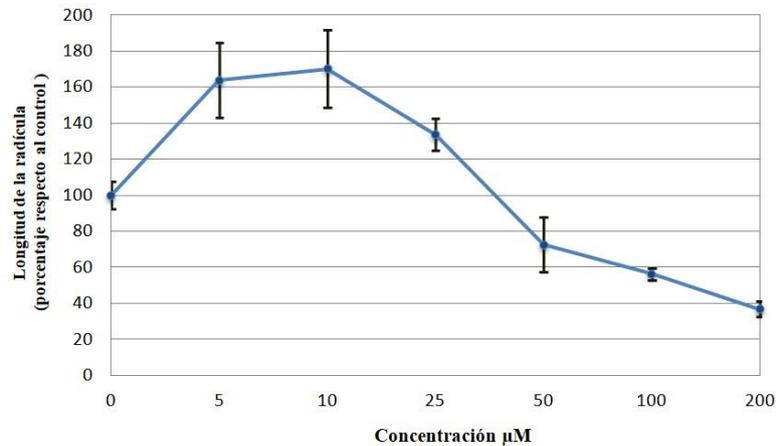


Figura 1: Efecto del isoxaben en la longitud de la raíz de plantas de maíz, después de 10 días que se inició la germinación. Se representa la media de los porcentajes de crecimiento en mm respecto a las plántulas no tratadas con isoxaben \pm la desviación estándar (n=4).

El isoxaben provoca alteraciones morfológicas en la raíz. Estas alteraciones consisten principalmente en un mayor grosor de la zona subapical, observada en raíces tratadas con isoxaben 10 μM (**Figura 3**). A medida que aumenta la concentración de isoxaben el tamaño de la raíz del maíz se reduce progresivamente (**Figura 2**) y el grosor del extremo de la raíz aumenta. El engrosamiento de la raíz causado por el isoxaben probablemente se debe a una interacción del inhibidor con el complejo enzimático celulosa sintasa que se refleja en una alteración de la orientación con que se depositan las microfibrillas de celulosa en la pared celular primaria. Es sabido que la celulosa sintasa no solo se encarga de polimerizar glucosa y formar cadenas β -(1,4)-glucano sino también de agrupar estas cadenas en microfibrillas y orientar la disposición de las microfibrillas en la pared celular. La dirección con que se expande una célula vegetal depende de la orientación mayoritaria de las microfibrillas de celulosa en la pared celular de tal forma que la actividad del isoxaben provocaría la pérdida de la respuesta anisotrópica (crecimiento en una dirección) (Allen *et al.*, 2021).

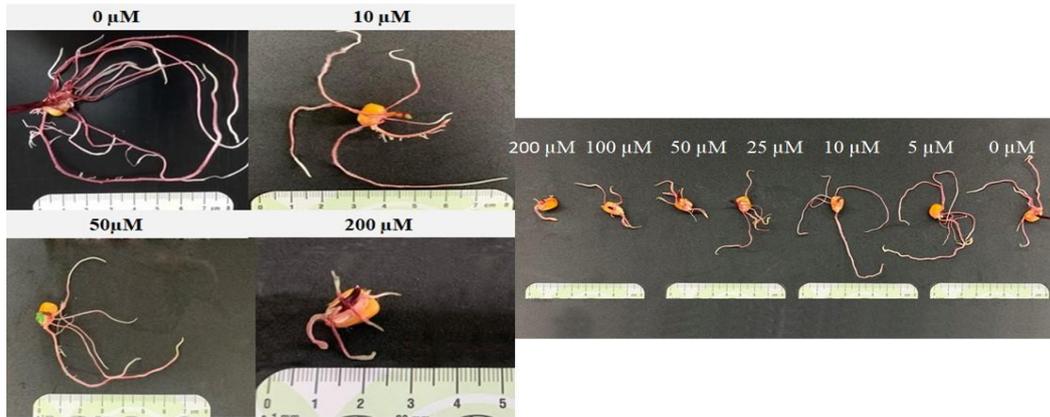


Figura 2: Efecto del isoxaben sobre el crecimiento de plántulas de maíz después de 10 días de tratamiento. La regla corresponde a 8 cm.

Cabe destacar que secciones de radículas tratadas con isoxaben experimentan un proceso de lignificación de la pared celular primaria denominado lignificación ectópica (**Figura 3**). Esta lignificación se detecta en concentraciones altas de isoxaben (200 μM) con el reactivo floroglucinol, específico de lignina. Es la primera vez que se describe lignificación ectópica frente a isoxaben que sí fue detectada para otros CBI. Se considera que este proceso de lignificación ectópica es una respuesta inespecífica que sirve para reforzar la pared celular y es relativamente frecuente frente a una gran variedad de estreses abióticos y bióticos. (Caño-Delgado *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2010; Miedes *et al.*, 2014).

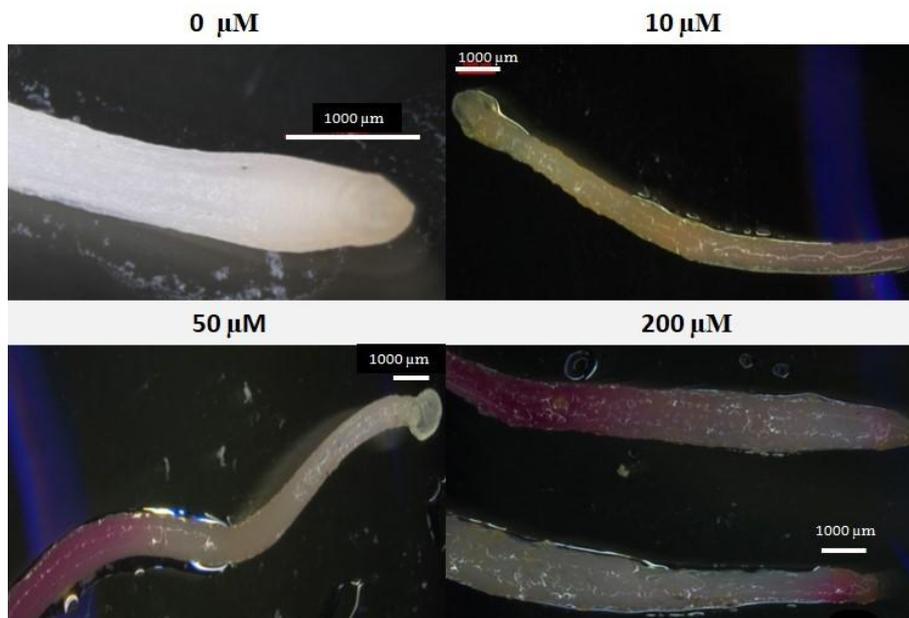


Figura 3: Secciones longitudinales de ápices radiculares de plántulas de maíz teñidas con floroglucinol y tratadas a diferentes concentraciones de isoxaben. La escala en color blanco corresponde a 1 mm.



Se ha estudiado el efecto del isoxaben sobre el cultivo de callos. Los callos de maíz fueron cultivados en presencia de un gradiente de concentración de isoxaben (0,1 μM , 1 μM , 0,1 nM, 1 nM, y 10 nM) y el crecimiento de los callos se determinó en función del aumento de peso fresco y seco. Las constantes de inhibición 50 (concentración de isoxaben que inhibe en un 50% el crecimiento de los callos respecto al crecimiento de los callos en ausencia de isoxaben- I_{50}) obtenidas fueron 10 y 1 nM para la inhibición de la ganancia de peso fresco (**Figura 4**) y seco (**Figura 5**) respectivamente. Se ha descrito que el isoxaben inhibe el crecimiento en el rango nanomolar, de la misma forma que ocurre frente a otros inhibidores de la biosíntesis de celulosa como diclobenil y taxtomina A, en especies dicotiledóneas con valores en *Arabidopsis* de I_{50} = 170 nM (Heim *et al.*, 1989) callos de *Phaesolus vulgaris* I_{50} = 10 nM (Díaz-Cacho *et al.*, 1999) y suspensiones celulares de soja I_{50} = 80 nM (Corio-Costet *et al.*, 1991).

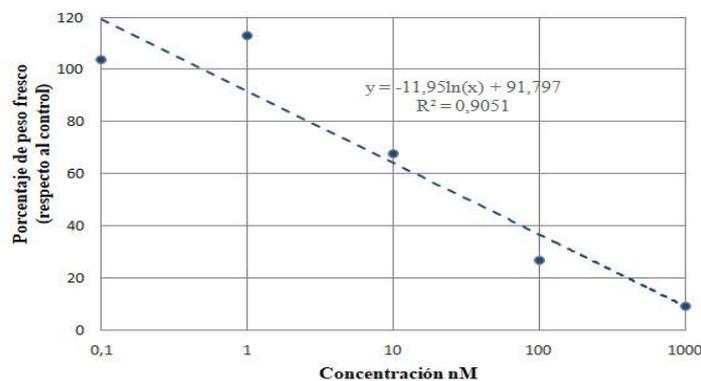


Figura 4: Porcentaje de peso fresco respecto al control de callos de maíz después de 30 días en presencia de concentraciones crecientes de isoxaben.

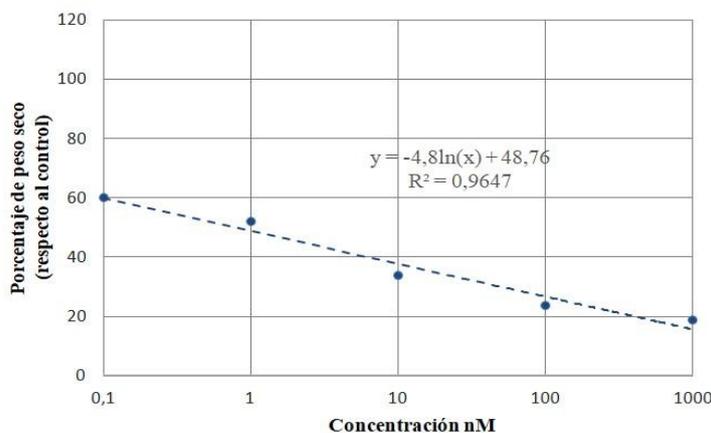


Figura 5: Porcentaje de peso seco respecto al control de callos de maíz después de 30 días en presencia de concentraciones crecientes de isoxaben.



Se obtuvieron y fraccionaron paredes celulares procedentes de callos control y tratados con isoxaben. Las fracciones de polisacáridos obtenidas fueron las solubles en CDTA, KOH 0,1 M y KOH 4 M. Además se valoró la cantidad de celulosa de la pared celular. En la fracción CDTA se obtuvieron las pectinas mientras que las fracciones KOH contienen las hemicelulosas débilmente unidas a la pared celular (KOH 0,1 M) y muy entrelazadas entre sí (KOH 4 M) y por tanto muy unidas a la pared celular. Como cabía esperar, las pectinas de la pared celular extraídas en la fracción CDTA resultaron ser minoritarias y apenas se observó variaciones en ellas provocadas por isoxaben. Sin embargo sí se observaron diferencias en las fracciones de hemicelulosas, resultando ser significativas ($p < 0,05$ en t-student). Un tratamiento de 30 días con una concentración de 10 nM de isoxaben provoca un aumento en torno al 40% de los polisacáridos de la fracción KOH 4 M que contienen las hemicelulosas, principalmente arabinosilanos, estrechamente unidas a la pared celular (**Figura 6**). El mismo tratamiento con isoxaben 10 nM redujo significativamente ($p < 0,05$ en t-student) el contenido de celulosa en aproximadamente un 20% (**Figura 7**). La reducción del contenido en celulosa que también pudo apreciarse mediante espectroscopía FTIR (**Figura 8**). Resultó coherente con la actividad inhibidora de la biosíntesis de celulosa que tiene el isoxaben y que ha sido previamente descrita en callos de alubia (Díaz-Cacho *et al.*, 1999) y *Arabidopsis thaliana* (Manfield *et al.*, 2004). Las hemicelulosas muy unidas a la pared celular, que aumentan tras un tratamiento con isoxaben probablemente se traten de arabinosilanos, ya que son las hemicelulosas principales en paredes de tipo II (Mélida *et al.*, 2009).

La modificación de la pared celular de callos de maíz ha sido descrita en callos de maíz, que ocurre después de un tratamiento con isoxaben también ha sido descrita en callos de maíz habituados a concentraciones de diclobenil muy por encima de la I_{50} (Mélida *et al.*, 2009). En estos callos, a medida que aumenta el nivel de tolerancia a diclobenil, se reduce progresivamente el contenido de celulosa y aumenta el de arabinosilanos muy entrecruzados por puentes fenólicos. Sorprendentemente, con esta modificación, las paredes celulares logran mantener su integridad estructural y las células siguen conservando la capacidad de dividirse y crecer aunque con tasas de crecimiento más bajas que los callos control. Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan en esta misma dirección: un simple tratamiento durante 30 días de callos de maíz con concentraciones de isoxaben en torno a la I_{50} provoca la misma



alteración de la pared celular: reducción del contenido de celulosa y aumento de hemicelulosas.

En paredes celulares de tipo I, donde las pectinas no son minoritarias y el xiloglucano es la hemicelulosa principal, la reducción del contenido de celulosa que causa el isoxaben se acompaña de un considerable aumento de las pectinas; y la modificación de la pared celular también permite a las células crecer.

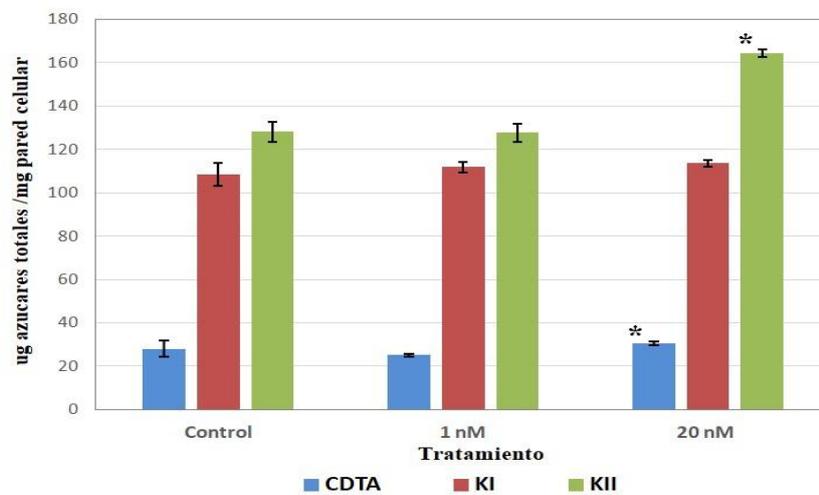


Figura 6: Fraccionamiento de la pared celular a partir de tres tratamientos para determinar la cantidad de azúcares que aparecen en cada concentración. Los tratamientos utilizados para el fraccionamiento son: columna de color azul tratamiento con CDTA, columna con color rojo KOH a 0,1 N, columna de color verde tratamiento KOH 4N. Se representan las medias \pm la desviación estándar de cada tratamiento (n=3). Siendo los marcados con (*) significativos ($p < 0,05$).

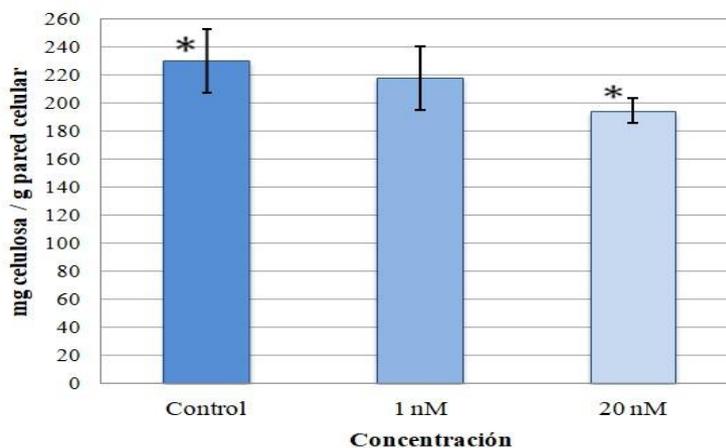


Figura 7: Valoración del contenido de celulosa en callos de maíz de los distintos tratamientos con isoxaben. Se representa las medias \pm las desviaciones estándar de cada tratamiento (n=4). Siendo los marcados con (*) significativos ($p < 0,05$).



Se detectan algunos cambios en la región de los espectros FTIR correspondiente a la huella digital (900-1200 cm^{-1}). En esta zona es donde absorben la gran parte de los polisacáridos de la pared celular (**Figura 8**), incluyendo la celulosa (1.500-1750 cm^{-1}) (Largo-Gosens *et al.*, 2014). En los espectros diferencia se observan algunas diferencias en los tratamientos con isoxaben (**Figura 8A y 8B**) y 1 nM-20 nM (**Figura 8C**). Concretamente un pico negativo (valle) en la zona digital (966 cm^{-1}), que posiblemente esté relacionado con la celulosa, y que corresponde a una menor cantidad de celulosa en las paredes celulares de los callos tratados con isoxaben 1 nM y 20 nM respecto al callo control (callo no tratado).

La actividad inhibitoria del isoxaben sobre la biosíntesis de la celulosa al valorar la celulosa por el método de Updegraff en callos tratados y observándose también en espectros FTIR detectándose un valle en torno a la longitud de onda de 1630 cm^{-1} , que se identifica con precursores de ácidos o anillos fenólicos y que probablemente indiquen una producción enriquecida de lignina en células tratadas con isoxaben (la lignina es un polímero de los ácidos fenólicos).

Los picos positivos en valores de longitud de onda agrupadas a anillos aromáticos (1108 cm^{-1}) y esterres fenólicos. Mientras tanto otros picos positivos agrupados mas débilmente notorios, se identifican con los anillos fenólicos, que contienen una mayor cantidad de fenoles en comparación con los callos controles (Largo-Gosens *et al.*, 2014).

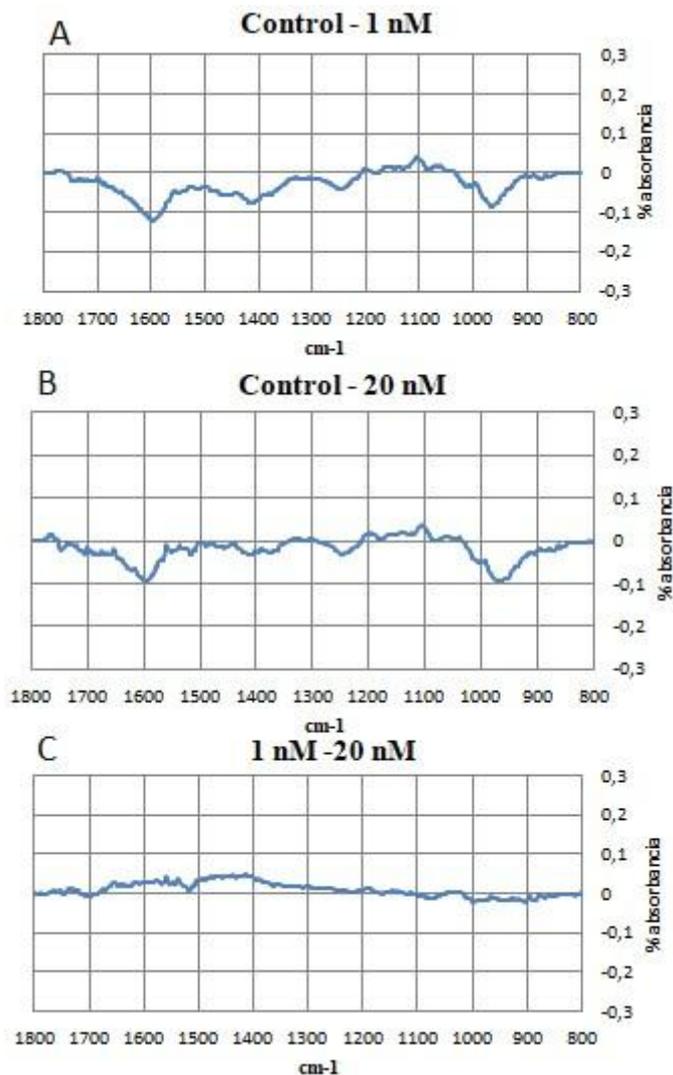


Figura 8: Espectros diferencia FTIR. Espectros diferencia obtenidos restando los espectros de la pared celular de callos control de las paredes celulares de callos tratados con isoxaben 1nM (A); 20 nM (B) y el espectro diferencia de pared celular de callo tratadas con isoxaben a 1 nM menos la concentración 20 nM (C).

El hecho de no observar lignificación ectópica en callos puede deberse a no haber dado con las condiciones necesarias ya que la lignificación depende de la concentración del inhibidor y el tiempo de exposición (Alonso-Simón *et al.*, 2004, 2011; Acebes *et al.*, 2010). El isoxaben se evidencia más tóxico en plántulas de maíz que en cultivos celulares, porque los callos del maíz están formados principalmente por paredes primarias, y por el contrario, las raíces de las plántulas están formadas por paredes secundarias que en ellas se produce lignina. Esto se observa de manera visual ya que la lignina reacciona colorimétricamente a la tinción



con floroglucinol (**Figura 3**). En este contexto cabe destacar la lignificación ectópica que se produce en cultivos celulares de maíz frente a diclobenil, conocido inhibidor de la biosíntesis de celulosa (Mélida *et al.*, 2015), habiéndose propuesto que la lignificación ectópica es una respuesta debida a un empobrecimiento en celulosa de la pared celular primaria (Moura *et al.*, 2010; Miedes *et al.*, 2014). El hecho de que la lignificación solo se haya observado en radículas y no en cultivos celulares probablemente se deba a la diferente sensibilidad de plántulas y cultivos celulares al isoxaben (**Figura 9**).



Figura 9: Efecto del isoxaben en la pared celular de los callos del maíz teñidas con floroglucinol sobre concentraciones crecientes de isoxaben. Se representa para callos del maíz en concentraciones cercanas a I_{50} , resultado negativo al no presentar color rojizo en la tinción con floroglucinol.

En resumen, se estudian en este trabajo los cambios de la pared celular de tipo II provocados por isoxaben. Se determinaron las alteraciones morfológicas en plántulas de maíz y se caracterizaron los efectos sobre la pared celular en callos tratados con una concentración de isoxaben en torno a su I_{50} . Se utilizaron para ello técnicas analíticas basadas en la diferente solubilidad de los polisacáridos de la pared celular, espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier (FTIR) y tinción con floroglucinol.

Globalmente, los resultados obtenidos señalan una alteración de la pared celular en la misma línea que la que se produce en callos de la misma especie habituados a crecer en altas concentraciones de diclobenil, otro inhibidor de la biosíntesis de la celulosa un tratamiento de 30 días de duración con una concentración de isoxaben del orden al valor de la correspondiente I_{50} , reduce el contenido de celulosa. La debilidad que se produce en la pared celular al disminuir la celulosa se compensa con el aumento de hemicelulosas muy unidas a la pared celular, probablemente arabinosilanos.



Este trabajo supone un primer paso para obtener callos habituados a crecer en concentraciones altas de isoxaben, material que resulta idóneo para estudiar la flexibilidad estructural de la pared primaria mediante las interacciones en las principales redes estructurales de polisacáridos y proteínas.

5. CONCLUSIONES

1. Concentraciones de isoxaben del orden micromolar alteran la morfología e inhiben el crecimiento en longitud de la radícula de maíz con una I_{50} de 10 μM , sin alterar la germinación de las semillas. Asimismo, concentraciones de isoxaben, del orden nanomolar reducen el crecimiento de callos de maíz con unos valores de I_{50} de 10 nM y 1 nM para la inhibición de la ganancia de peso fresco y seco respectivamente.
2. El aislamiento de paredes celulares y su posterior fraccionamiento en las principales familias de polisacáridos indican que tras una exposición de 30 días de callos de maíz a una concentración de isoxaben 20 nM se reduce un 20% el contenido de celulosa y aumenta un 40% el de hemicelulosa estrechamente unidas a la pared celular primaria.
3. La espectroscopía FTIR de paredes celulares junto con la obtención de los espectros diferencia entre callos tratados con isoxaben y callos no tratados corroboran el descenso del contenido de celulosa.
4. El tratamiento de plántulas con isoxaben 200 μM induce la formación de lignina en la pared celular primaria en una zona coincidente con el meristemo radicular. Sin embargo, este proceso, conocido como lignificación ectópica, no es observado en callos.



6. REFERENCIAS

- Liepman, A. H., Cavalier, D. M., Lerouxel, O., y Keegstra, K. (2018) "Cell wall structure, biosynthesis and assembly", en Roberts, J. A. y Gonzalez-Carranza, Z (eds.). *Plant cell separation and adhesion*. 25.ª ed. Reino Unido: Blackwell Publishing Ltd, pp. 8–39.
- Acebes, J. L., Encina, A., García-Angulo, P., Alonso-Simón, A., Mérida, H. y Álvarez, J. M. (2010) "Cellulose biosynthesis inhibitors: their uses as potencial herbicides and as tools in cellulose and cell wall structural plasticity research", en Lejeune, A. y Desprez, T. *Cellulose: structure and properties, derivatives and industrial uses*. Hauppauge: Nova Science Publishers, pp. 39–73.
- Albersheim, P., Darvill, A. G., Davis, K. R., Doares, S. H., Gollin, D. J., O'Neill, R., Toubart, P. R. y York, W. S. (1987) "Oligosaccharins - complex carbohydrate regulatory molecules", *The cell surface in signal transduction*, pp. 147–149.
- Albersheim, P., Darvill, A. G., O'Neill, M. A., Schols, H. A. y Voragen, A. G. J. (1996) "An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants", *Progress in biotechnology*, 14(C), pp. 47–55.
- Allen, H., Wei, D., Gu, Y. y Li, S. (2021) "A historical perspective on the regulation of cellulose biosynthesis", *Carbohydrate polymers*, 252, p. 117022. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117022.
- Alonso-Simón, A., Encina, A. E., García-Angulo, P., Álvarez, 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", *Taylor & Francis*, 6(8), pp. 1104–1110.
- Álvarez, C., García, I., Romero, L. C. y Gotor, C. (2012) "Mitochondrial sulfide detoxification requires a functional isoform O-Acetylserine(thiol)lyase C in *Arabidopsis thaliana*", *Molecular plant*, 5(6), pp. 1217–1226.
- 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.
- Aspinall, G. O. (1980) "Chemistry of cell wall polysaccharides", *Carbohydrates: structure and function*, 3, pp. 473–500.
- Atmodjo, M. A., Hao, Z. y Mohnen, D. (2013) "Evolving views of pectin biosynthesis", *The annual review of plant biology*, 64(1), pp. 747–779.
- Awwad, F., Bertrand, G., Grandbois, M. y Beaudoin, N. (2019) "Auxin protects *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures from programmed cell death induced by the cellulose biosynthesis inhibitors thaxtomin A and isoxaben", *BMC Plant biology*, 19(1), pp. 1–13.
- Barnes, W. J. y Anderson, C. T. (2018) "Cytosolic invertases contribute to cellulose biosynthesis and influence carbon partitioning in seedlings of *Arabidopsis thaliana*", *The plant journal*, 94(6), pp. 956–974.
- 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*, 94(3), pp. 497–512.



- Benfey, P. N., Linstead, P. J., Roberts, K., Schiefelbein, J. W., Hauser, M. T. y Aeschbacher, R. A. (1993) "Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis", *Development*, 119(1), pp. 57–70.
- Bosca, S., Barton, C. J., Taylor, N. G., Ryden, P., Neumetzler, L., Pauly, M., Roberts, K. y Seifert, G. J. (2006) "Interactions between MUR10/CesA7-Dependent secondary cellulose biosynthesis and primary cell wall structure", *Plant physiology*, 142(4), pp. 1353–1363.
- Brabham, C., Stork, J., Barrett, M. y DeBolt, S. (2018) "Grass cell walls have a role in the inherent tolerance of grasses to the cellulose biosynthesis inhibitor isoxaben", *Pest management science*, 74(4), pp. 878–884.
- Bulmer, G. S., de Andrade, P., Field, R. A. y van Munster, J. M. (2021) "Recent advances in enzymatic synthesis of β -glucan and cellulose", *Carbohydrate research*, 508, p. 108411. doi:10.1016/j.carres.2021.108411.
- 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*, 34(3), pp. 351–362.
- Carpita, N. C. (1996) "Structure and biogenesis of the cell walls of grasses", *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 47, pp. 445–76.
- Carpita, N. C. y Gibeaut, D. M. (1993) "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth", *Plant journal*, 3(1), pp. 1–30.
- Corio-Costet, M. F., Dall’Agnese, 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.
- Daras, G., Templalexis, D., Avgeri, F., Tsitsekian, D., Karamanou, K. y Rigas, S. (2021) "Updating insights into the catalytic domain properties of plant cellulose synthase (CesA) and cellulose synthase-like (Csl) Proteins", *Molecules* 2021, 26(14), p. 4335. doi:10.3390/molecules26144335.
- 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.
- Desprez, T., Juraniec, M., Crowell, E. F., Jouy, H., Pochylova, Z., Parcy, F., Höfte, H., Gonneau, M. y Vernhettes, S. (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., Refrégier, 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. (1999) "Cell wall modifications in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures tolerant to isoxaben", *Physiologia plantarum*, 107(1), pp. 54–59.
- Dische, Z. (1962) "Influence of the nature of the secretory stimulus on the composition of the carbohydrate moiety of glycoproteins of the submaxillary saliva", *Archives of biochemistry and biophysics*, 97 (3), pp. 459–469.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956) "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Analytical chemistry*, 28(3), pp. 350–356.
- 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.



- Ebringerová, A. (2005) "Structural diversity and application potential of hemicelluloses", *Macromolecular symposia*, 232, pp. 1–12.
- Encina, A. E., Moral, R. M., Acebes, J. L. y Álvarez, J. M. (2001) "Characterization of cell walls in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures tolerant to dichlobenil", *Plant science*, 160(2), pp. 331–339.
- Encina, A., Sevillano, J. M., Acebes, J. L. y Alvarez, J. (2002) "Cell wall modifications of bean (*Phaseolus vulgaris*) cell suspensions during habituation and dehabituation to dichlobenil", *Physiologia plantarum*, 114(2), pp. 182–191.
- Endler, A., Kesten, C., Schneider, R., Zhang, Y., Ivakov, A., Froehlich, A., Funke, N. y Persson, S. (2015) "A mechanism for sustained cellulose synthesis during salt stress", *Cell*, 162(6), pp. 1353–1364.
- Endler, A. y Persson, S. (2011) "Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*", *Molecular plant*, 4(2), pp. 199–211.
- Fry, S.C., Wilkins, M. (ed) (1988) *The growing plant cell and metabolic analysis*. 1.ªed. Harlow: Longman Scientific and Technical.
- 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", *Journal of plant physiology*, 166(12), pp. 1229–1240.
- Gardiner, J. C., Taylor, N. G. y Turner, S. R. (2003) "Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem", *The plant cell*, 15(8), pp. 1740–1748.
- Gutierrez, R., Lindeboom, J. J., Paredez, A. R., Emons, A. M. C. y Ehrhardt, D. W. (2009) "*Arabidopsis* cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments", *Nature cell biology* 2009,11(7), pp. 797–806.
- Harholt, J., Suttangkakul, A. y Scheller, H. V. (2010) "Biosynthesis of pectin", *Plant physiology*, 153(2), pp. 384–395.
- 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. doi:10.3389/fpls.2016.02056.
- 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 physiol*, 90, pp. 146–150.
- Huang, L., Li, X. y Zhang, C. (2021) "Endosidin20-1 is more potent than endosidin20 in inhibiting plant cellulose biosynthesis and molecular docking analysis of cellulose biosynthesis inhibitors on modeled cellulose synthase structure", *The plant journal*, 106(6), pp. 1605–1624.
- Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D. y Albersheim, P. (1973) "The structure of plant cell walls III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components", *Plant physiology*, 51(1), pp. 188–197.
- Kurek, I., Kawagoe, Y., Jacob-Wilk, D., Doblin, M. y Delmer, D. (2002) "Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains", *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America*, 99(17), pp. 11109–11114.
- Lane, D. R., Wiedemeier, A., Peng, L., Höfte, H., Vernhettes, S., Desprez, T., Hocart, C. H., Birch, R. J., Baskin, T. I., Burn, J. E., Arioli, T., Betzner, A. S. y Williamson, R. E. (2001) "Temperature-sensitive alleles of RSW2 link the KORRIGAN Endo-1,4-β-Glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in *Arabidopsis*", *Plant physiology*, 126(1), pp. 278–288.



- Largo-Gosens, A., Hernández-Altamirano, M., García-Calvo, L., Alonso-Simón, A., Álvarez, J. y 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. doi:10.3389/fpls.2014.00303.
- Larson, R. T. y McFarlane, H. E. (2021) "Small but mighty: an update on small molecule plant cellulose biosynthesis inhibitors", *Plant & cell physiology*, 62(12), pp. 1828–1838.
- 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.
- Liu, Q., Luo, L. y Zheng, L. (2018) "Lignins: biosynthesis and biological functions in plants", *International journal of molecular sciences*, 19(2). doi:10.3390/IJMS19020335.
- Manfield, I. W., Orfila, C., McCartney, L., Harholt, J., Bernal, A. J., Scheller, H. V., Gilmartin, P. M., Mikkelsen, J. D., Knox, J. P. y Willats, W. G. T. (2004) "Novel cell wall architecture of isoxaben-habituated *Arabidopsis* suspension-cultured cells: global transcript profiling and cellular analysis", *The plant journal*, 40(2), pp. 260–275.
- Mansoori, N., Timmers, J., Desprez, T., Kamei, C. L. A., Dees, D. C. T., Vincken, J. P., Visser, R. G. F., Fte, H. H., Vernhettes, S. y Trindade, L. M. (2014) "KORRIGAN1 interacts specifically with integral components of the cellulose synthase machinery", *Plos one*, 9(11), p. e112387. doi:10.1371/journal.pone.0112387.
- McFarlane, H. E., Döring, A. y Persson, S. (2014) "The cell biology of cellulose synthesis", *Annual reviews*, 65, pp. 69–94.
- Mélida, H., García-Angulo, P., Alonso-Simón, A., Encina, A., Álvarez, J. 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., Bruce Downie, A., Voiniciuc, C., Haughn, G. W. y de Bolt, 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. doi:10.3389/fpls.2014.00358.
- Mohnen, D. (2008) "Pectin structure and biosynthesis", *Current opinion in plant biology*, 11(3), pp. 266–277.
- Moura, J. C. M. S., Bonine, C. A. V., de Oliveira Fernandes Viana, J., 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", *Physiologia plantarum*, 15(3), pp. 473–497.
- 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.
- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P. y Delmer, D. (2002) "Sitosterol- β -glucoside as primer for cellulose synthesis in plants", *Science*, 295(5552), pp. 147–150.



- Persson, S., Paredez, A., Carroll, A., Palsdottir, H., Doblin, M., Poindexter, P., Khitrov, N., Auer, M. y Somerville, C. R. (2007) "Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*", *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America*, 104(39), pp. 15566–15571.
- Polko, J. K., Barnes, W. J., Voiniciuc, C., Doctor, S., Steinwand, B., Hill, J. L., Tien, M., Pauly, M., Anderson, C. T. y Kieber, J. J. (2018) "SHOU4 proteins regulate trafficking of cellulose synthase complexes to the plasma membrane", *Current biology*, 28(19), pp. 3174-3182.
- Polko, J. K. y Kieber, J. J. (2019) "The regulation of cellulose biosynthesis in plants", *The plant cell*, 31(2), pp. 282–296.
- Purushotham, P., Ho, R. y Zimmer, J. (2020) "Architecture of a catalytically active homotrimeric plant cellulose synthase complex", *Science*, 369(6507), pp. 1089–1094.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A., Christensen, J. H. y Boerjan, W. (2004) "Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids", *Phytochemistry*, 3, pp. 29–60.
- Rennie, E. A. y Scheller, H. V. (2014) "Xylan biosynthesis", *Current opinion in biotechnology*, 26, pp. 100–107.
- Rose, J. K. C. y Lee, S. J. (2010) "Straying off the highway: Trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome", *Plant physiology*, 153(2), pp. 433–436.
- Roudier, F., Fernandez, A. G., Fujita, M., Himmelspach, R., Borner, G. H. H., Schindelman, G., Song, S., Baskin, T. I., Dupree, P., Wasteneys, G. O. y Benfey, P. N. (2005) "COBRA, an *Arabidopsis* extracellular Glycosyl-Phosphatidyl Inositol-Anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation", *The plant cell*, 17(6), pp. 1749–1763.
- Sabba, R. P. y Vaughn, K. C. (1999) "Herbicides that inhibit cellulose biosynthesis", *Weed science*, 47(6), pp. 757–763.
- Saxena, I. M. y Brown, R. M. (2005) "Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts", *Annals of botany*, 96(1), pp. 9–21.
- Scheller, H. V. y Ulvskov, P. (2010) "Hemicelluloses", *Annual reviews*, 61, pp. 263–289.
- Sebastian, D. J., Fleming, M. B., Patterson, E. L., Sebastian, J. R. y Nissen, S. J. (2017) "Indaziflam: a new cellulose-biosynthesis-inhibiting herbicide provides long-term control of invasive winter annual grasses", *Pest management science*, 73(10), pp. 2149–2162.
- Sethaphong, L., Haigler, C. H., Kubicki, J. D., Zimmer, J., Bonetta, D., DeBolt, S. y Yingling, Y. G. (2013) "Tertiary model of a plant cellulose synthase", *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America*, 110(18), pp. 7512–7517.
- Sharp, J. K., Valent, B. y Albersheim, P. (1984) "Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean.", *Journal of biological chemistry*, 259(18), pp. 11312–11320.
- Shedletzky, E., Shmuel, M., Trainin, T., Kalman, S. y Delmer, D. (1992) "Cell wall structure in cells adapted to growth on the cellulose-synthesis inhibitor 2,6-Dichlorobenzonitrile a comparison between two dicotyledonous plants and a graminaceous monocot", *Plant physiology*, 100(1), pp. 120–130.



- Slabaugh, E., Sethaphong, L., Xiao, C., Amick, J., Anderson, C. T., Haigler, C. H. y Yingling, Y. G. (2014) "Computational and genetic evidence that different structural conformations of a non-catalytic region affect the function of plant cellulose synthase", *Journal of experimental botany*, 65(22), pp. 6645–6653.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S. y Youngs, H. (2004) "Toward a systems approach to understanding plant cell walls", *Science*, 306(5705), pp. 2206–2211.
- Tateno, M., Brabham, C. y Debolt, S. (2016) "Cellulose biosynthesis inhibitors – a multifunctional toolbox", *Journal of experimental botany*, 67(2), pp. 533–542.
- Taylor, N. G., Howells, R. M., Huttly, A. K., Vickers, K. y Turner, S. R. (2003) "Interactions among three distinct CesaA 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., Laurie, S. y Turner, S. R. (2000) "Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose Synthesis in *Arabidopsis*", *The plant cell*, 12(12), pp. 2529–2539.
- Tucker, M. R., Lou, H., Aubert, M. K., Wilkinson, L. G., Little, A., Houston, K., Pinto, S. C. y Shirley, N. J. (2018) "Exploring the role of cell wall-related genes and polysaccharides during plant development", *Plants*, 7(2). doi:10.3390/plants7020042.
- Updegraff, D. M. (1969) "Semimicro determination of cellulose in biological materials", *Analytical biochemistry*, 32(3), pp. 420–424.
- Vain, T., Crowell, E. F., Timpano, H., Biot, E., Desprez, T., Mansoori, N., Trindade, L. M., Pagant, S., Robert, S., Höfte, H., Gonneau, 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., Tracy Nixon, B., Haigler, C. H., Kalluri, U., Coates, L., Langan, P., Smith, J. C., Meiler, J. y O'Neill, H. (2015) "A structural study of CESA1 catalytic domain of *Arabidopsis* cellulose synthesis complex: evidence for CESA trimers", *Plant physiology*, 170(1), pp. 123–135.
- Vaughn, K. C. (2002) "Cellulose biosynthesis inhibitor herbicides", *Herbicide classes in development*, pp. 139–150.
- Wakabayashi, K. O. y Böger, P. (2004) "Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 1): the photosynthetic electron transport system", *Weed biology and management*, 4, pp. 8–18.
- Zhang, T., Zheng, Y. y Cosgrove, D. J. (2016) "Spatial organization of cellulose microfibrils and matrix polysaccharides in primary plant cell walls as imaged by multichannel atomic force microscopy", *The plant journal*, 85(2), pp. 179–192.
- Zhu, X., Li, S., Pan, S., Xin, X. y Gu, Y. (2018) "CSII, PATROL1, and exocyst complex cooperate in delivery of cellulose synthase complexes to the plasma membrane", *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America*, 115(15), pp. 3578–3587.