

Introducción

1. La familia de las β -D-galactosidasas de *Cicer arietinum*

En *Cicer arietinum* se ha identificado una familia multigénica de β -galactosidasas, de la que hasta el momento se han identificado 4 miembros (Esteban y col., 2005), que pertenecen a la familia 35 de las glicosilhidrolasas (GH35) ya que presentan el sitio activo característico de esta familia. La purificación de distintas β -galactosidasas de garbanzo se describió por primera vez en 1989 por Dopico y col. Entre las β -galactosidasas estudiadas se caracterizó la β III-Gal, presente en paredes celulares de epicotilos de garbanzo y responsable del proceso autolítico de las mismas (Dopico y col., 1989; 1990a).

Dada la importancia de estas enzimas en el proceso de crecimiento de epicotilos de *C. arietinum*, se aislaron distintos clones que codifican β -galactosidasas cuyos transcritos están presentes en tejidos vegetativos en crecimiento (Esteban y col., 2003; 2005), en concreto 4 clones nombrados CanBGal-1, CanBGal-3, CanBGal-4 y CanBGal-5 (Esteban y col., 2003; 2005), que corresponden con los genes de copia única denominados *CanBGal-1*, *CanBGal-3*, *CanBGal-4* y *CanBGal-5*. Estos genes codifican las β -galactosidasas β I-Gal, β III-Gal, β IV-Gal y β V-Gal, respectivamente. Las proteínas β III-Gal y β IV-Gal son las que presentan el mayor porcentaje de aminoácidos idénticos (un 81%), mientras que la β I-Gal y la β V-Gal no superan el 63% de la identidad, tanto entre ellas como con respecto a las otras 2 β -galactosidasas de garbanzo.

Las β -galactosidasas β III-Gal, β IV-Gal y β V-Gal presentan una secuencia hidrofóbica en el extremo N-terminal de 29, 23 y 26 aminoácidos, que al ser eliminadas de la secuencia dan lugar a proteínas maduras de 77.9, 78 y 80 kDa, que por su tamaño pertenecen al grupo 1 de β -galactosidasas establecido por Ahn y col. (2007), con puntos isoeléctricos (pI) teóricos de 8.06, 5.79 y 8.45, respectivamente. La proteína β I-Gal, al igual que el resto de miembros caracterizados de la familia, presenta un péptido señal en el extremo N-terminal de 24 aminoácidos y un pI de 8.05. Sin embargo, la proteína madura tiene un peso molecular de 90.33 kDa, dado que presenta en su extremo C-terminal la secuencia correspondiente al dominio similar a lectina (Esteban y col., 2005). Estas características determinan que la β I-Gal se incluya dentro del grupo 2 de β -

galactosidasas (Ahn y col., 2007), siendo la única de las β -galactosidasas descritas en garbanzo encuadrada en este grupo. Todas las β -galactosidasas muestran al menos un sitio de N-glicosidación. La β I-Gal y la β III-Gal tienen solo uno mientras que la β IV-Gal y la β V-Gal tienen cuatro y dos, respectivamente.

El análisis de la acumulación de los transcritos de los cuatro genes en función del órgano y del estado de desarrollo, así como la localización de las correspondientes proteínas ha permitido postular la participación de cada una de las β -galactosidasas en diferentes procesos fisiológicos, aunque su función aún no está totalmente establecida.

Los transcritos *CanBGal-1*, que se encuentran en todos los órganos de plántulas, presentan un patrón de acumulación muy similar al de *CanBGal-4*, indicando en ambos casos una relación con momentos del desarrollo en los que la tasa de elongación es baja, tanto en epicotilos de plántulas etioladas como en entrenudos de plantas verdes, siendo los niveles de mRNA máximos en hojas maduras, en los entrenudos más basales de plantas de 11 días y en epicotilos de ocho días de edad (Esteban y col., 2005).

Por su parte, la proteína β I-Gal se ha detectado en órganos elongantes, como epicotilos y mesocotilos en plántulas etioladas, y en los entrenudos de plantas de 11 días, con el nivel más bajo en el entrenudo más joven. Esta proteína se acumula principalmente en células cuyas paredes están sufriendo algún tipo de engrosamiento encaminado a aumentar la rigidez de la pared celular, como por ejemplo, en células de esclerénquima que rodean el cilindro vascular en epicotilos, o en el colénquima y fibras del floema en tallos, que se caracterizan por presentar una pared celular primaria engrosada para llevar a cabo su función como tejido de sostén en la planta (Martín y col., 2011). Además, la proteína β I-Gal también se localiza en las células del floema primario de las zonas basales y en los elementos conductores del xilema primario más cercanos a la zona procambial y que todavía no han completado su diferenciación (Martín y col., 2011), por lo que podría actuar en las primeras fases de este proceso, antes de la completa formación de los elementos maduros. En ejes embrionarios, la β I-Gal se asocia al tejido vascular de las zonas más maduras de la radícula, xilema primario y fibras del floema, posteriores a la germinación (Hernández-Nistal y col., 2014). Se ha indicado, pues, que la β I-Gal actúa favoreciendo la compactación de la pared celular en determinados tejidos tras el cese de la elongación y, al mismo tiempo, permite la diferenciación de los distintos tipos celulares, capacitándolos para desarrollar

su función, como la de soporte del colénquima y de las fibras del floema, o la función de transporte en el floema y xilema primarios (Martín y col., 2011).

Diferentes trabajos han abordado el estudio de la función de la proteína codificada por el gen *CanBGal-3*, debido a la importancia que apuntaban los primeros estudios con la proteína β III-Gal. Esta proteína es la responsable del proceso autolítico de las paredes celulares, como se ha indicado anteriormente (Dopico y col., 1989; 1990a) y actúa sobre un arabinogalactano de la fracción péctica de la pared celular (Dopico y col., 1990b), incrementando su actividad durante el crecimiento de los epicotilos (Dopico y col., 1990c). Numerosas evidencias, como el hecho de que la máxima capacidad de la β III-Gal para hidrolizar paredes celulares ocurra en epicotilos de 4 días, momento de máximo crecimiento (Dopico y col., 1991), y la correlación de los niveles de la proteína β III-Gal con la inducción del crecimiento por auxina (Valero y Labrador, 1993; 1995) y con la inhibición del crecimiento por estrés hídrico (Valero y Labrador, 1996) permitieron establecer una clara relación entre la actuación de la β III-Gal sobre las pectinas de la pared celular y el crecimiento de los epicotilos.

La acumulación de transcritos *CanBGal-3* presenta niveles elevados durante el crecimiento de los epicotilos, concretamente en el 4º día después de la siembra (Esteban y col., 2003), coincidiendo con la máxima capacidad de crecimiento del epicotilo y con la máxima actividad autolítica (Dopico y col., 1991). A partir de ese momento, se produce una disminución en los niveles de transcritos, en consonancia con una disminución en el crecimiento del epicotilo. En epicotilos de 2 y 3 días, que presentan poca elongación, no se detectan estos transcritos (Esteban y col., 2003), lo que concuerda con la ausencia de la proteína β III-Gal en epicotilos de estas edades (Dopico y col., 1991). En entrenudos de plantas, los transcritos del *CanBGal-3* se acumulan mayoritariamente en el tercer y cuarto entrenudo (Esteban y col., 2005), con alta tasa de elongación (Jiménez y col. 2006), aunque son prácticamente indetectables en el quinto entrenudo, mas joven (Esteban y col., 2005). Asimismo, se produjo una acumulación de transcrito de *CanBGal-3* justo después de la emergencia de la radícula y el epicotilo durante la germinación de las semillas (Hernández-Nistal y col., 2006). En plántulas de 4 días, la mayor acumulación de transcrito ocurre en epicotilos y en menor medida el mesocotilos y radículas, mientras que no aparecen en el gancho plumular y cotiledones. En plantas adultas los transcritos *CanBGal-3* se acumulan mayoritariamente en hojas

maduras, y también están presentes en hojas juveniles, vainas, flores y semillas (Esteban y col., 2005).

La sobreexpresión de la proteína β III-Gal de garbanzo en tubérculos de *Solanum tuberosum* causó un aumento de la actividad β -galactosidásica y β -galactanásica de las paredes celulares de los tubérculos. Como consecuencia, la composición de la pared celular se alteró, con una reducción de la cantidad de galactosa (Martín y col., 2005). Los tubérculos transformados presentaron un aumento en la cantidad de homogalacturonano, que estaría relacionado con la reducción del galactano unido a el RG I como consecuencia de la actuación de la β III-Gal en este polisacárido péctico (Martín y col., 2005).

La inmunolocalización de la β III-Gal indica su actuación en el tejido vascular en formación. Esta proteína se localiza en el xilema y el floema primario aunque su presencia en elementos del xilema está restringida a zonas donde no se ha completado la diferenciación como la sección basal del epicotilo de 4 días de edad o la sección central del epicotilo de 8 días de edad, por lo que se postula un papel de la β III-Gal relacionado en los primeros estados de diferenciación del xilema (Martín y col., 2013). Además, la β III-Gal podría actuar de manera coordinada con otras enzimas implicadas en este proceso, concretamente con dos miembros de la familia de las β -galactosidasas, la β I-Gal y la β IV-Gal, las cuales también se encuentran presentes en el xilema primario (Martín y col., 2008; Martín y col., 2011), y que podrían ser las responsables de la reducción de los niveles de galactano observados en este tejido desde el ápice hasta la base del tallo. Así, la β III-Gal podría actuar en los primeros estados de la formación del tejido vascular, permitiendo la diferenciación celular y confiriendo la fortaleza necesaria a la pared celular, mientras que la β I-Gal y la β IV-Gal estarían implicados en los estados finales del desarrollo de este tejido (Martín y col., 2013). La proteína β III-Gal, al igual que la β I-Gal, está presente en ejes embrionarios asociada al tejido vascular en órganos de mayor edad, aunque se localizó de manera más temprana que la β I-Gal (Hernández-Nistal y col., 2014).

Los transcritos *CanBGal-4*, al igual que los *CanBGal-1* se acumulan en estados más avanzados del crecimiento de los epicotilos, aumentando progresivamente con la edad de los mismos, desde los 2 a los 8 días. La misma tendencia se observa en los entrenudos de plantas adultas, donde los transcritos se acumulan en todos los

entrenados, excepto en los más jóvenes o apicales. En plántulas de 4 días, la mayor acumulación de transcrito se observa en mesocotilos y raíces y en menor medida en epicotilos, ganchos plumulares y cotiledones. En plantas adultas, los órganos que presentan los niveles más altos de acumulación son la raíz adulta y la vaina inmadura (Esteban y col., 2005). Durante la germinación, la acumulación de transcritos del gen *CanBGal-4* comienza después de la emergencia radicular, cuando aún no ha emergido el epicotilo, y la mayor acumulación ocurre justo después de la emergencia del mismo (Hernández-Nistal y col., 2006).

La proteína β IV-Gal, al igual que ocurría con β I-Gal, se acumula de forma específica siguiendo el mismo patrón de sus transcritos (Martín y col., 2009), en estados avanzados del desarrollo de epicotilos y tallos. La β IV-Gal presenta una relación inversa entre la capacidad de crecimiento y los niveles de proteína, mientras que los niveles de β I-Gal presentan más fluctuaciones (Martín y col., 2009; 2011). La localización principal de la β IV-Gal es el tejido vascular, principalmente en el xilema y floema primario. En plántulas, también se localiza en células esclerenquimáticas alrededor del cilindro vascular, en fibras del floema y del xilema asociadas a células traqueales, mientras que en los tallos de plantas aparece en el colénquima y fibras del floema. Todos estos tejidos se caracterizan por presentar una pared celular primaria engrosada que les permite llevar a cabo su función como tejido de sostén en la planta (Martín y col., 2009). Además, la β IV-Gal, a diferencia de la β I-Gal (Martín y col., 2009; 2011), aparece en el xilema de tejidos apicales donde no ha cesado el crecimiento, como son la parte apical de los epicotilos de plántulas o el entrenudo más apical del tallo en plantas, lo que sugiere que en esas células es donde comienza la diferenciación y donde la degradación de la pared celular primaria empieza a ocurrir. Asimismo, la β IV-Gal se localiza en ejes embrionarios juveniles y parece estar implicada en el desarrollo de los haces vasculares en los primeros estados del desarrollo. Sorprende la presencia de esta proteína en este estadio, ya que no se encontraron transcritos a esa edad. Por tanto, la fuente de esta proteína en estados tempranos de la germinación podría ser el cotiledón, ya que la β IV-Gal es la única β -galactosidasa de la familia cuyos transcritos están presentes en la semilla madura (Hernández-Nistal y col., 2014).

Los patrones de localización de las proteínas β IV-Gal y β I-Gal se solapan en muchas ocasiones, lo que podría indicar funciones similares en el desarrollo de la

planta. Sin embargo, existen diferencias estructurales entre la β IV-Gal y β I-Gal, como la presencia en la β I-Gal del dominio de unión a carbohidratos típico de lectinas animales, que no se encuentra en la β IV-Gal (Esteban y col., 2005), o diferencias en el punto isoeléctrico, presentando la β IV-Gal un pI ácido que contrasta con el pI básico del resto de las β -galactosidasas de garbanzo. Además, estas dos proteínas aparecen en ramas distintas del dendograma de frecuencias que representa las relaciones evolutivas entre las cuatro β -galactosidasas de garbanzo y las β -galactosidasas de otras especies vegetales (Esteban y col., 2005). Todas estas diferencias, unidas a las diferencias puntuales anteriormente señaladas en su acumulación y distribución, podrían indicar que las proteínas β IV-Gal y β I-Gal puedan tener funciones diferentes, actuando incluso sobre diferentes sustratos.

Los transcritos *CanBGal5* presentan la máxima expresión en los momentos iniciales del desarrollo y se acumulan en regiones que presentan tejido meristemático, como ganchos plumulares, y en los momentos previos a la emergencia radicular (Esteban y col., 2005; Hernández-Nistal y col., 2006). Estos transcritos se acumulan mayoritariamente en epicotilos de plántulas muy jóvenes y descienden a medida que aumenta la edad de los mismos. Además, en plantas adultas, la mayor acumulación de transcrito aparece en el entrenudo apical y disminuye paulatinamente hacia el entrenudo basal, así como en vainas y semillas jóvenes (Esteban y col., 2005).

Estudios de inmunolocalización de la proteína β V-Gal confirman su presencia en estados tempranos del desarrollo y en órganos en crecimiento activo como el gancho plumular, epicotilos juveniles o el quinto entrenudo de planta adulta (Martín y col., 2009). La β V-Gal está implicada en las modificaciones de la pared celular durante los primeros estados del desarrollo y en procesos en los que se requiere una alta tasa de división celular seguido de una rápida expansión, como pueden ser las fases iniciales del crecimiento del epicotilo o la formación de las raíces secundarias (Martín y col., 2009). En el primer caso, la β V-Gal se acumula en el meristemo apical y disminuye en las células parenquimáticas desde la zona apical hacia la basal de epicotilos, tallos y radículas (Martín y col., 2009). Además, se detecta en la zona procambial y en las células del periciclo que están dando lugar a las raíces laterales (Martín y col., 2009). En el proceso de germinación, la proteína β V-Gal se localiza al inicio de la misma y está ampliamente distribuida en los tejidos embrionarios más juveniles, por lo que parece

estar implicada en cambios en la pared celular que permiten la germinación de las semillas de garbanzo (Hernández-Nistal y col., 2014).

2. La familia de las β -D-galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*

En el genoma de *A. thaliana* se ha identificado una familia multigénica formada por 17 genes que codifican β -galactosidasas de la familia GH35 (Ahn y col., 2007). Estos genes, denominados *AtBGAL1* a *AtBGAL17*, presentan entre 12 y 19 exones y, a excepción del *AtBGAL17*, podrían tener un ancestro común (grupo monofilético) con al menos 7 intrones y un dominio similar a lectinas que posteriormente se perdió en alguno de ellos (Ahn y col., 2007). Excepto el gen *AtBGAL17*, cuya estructura es más similar a la de los genes de β -galactosidasas animales que a los otros genes *AtBGAL* de arabisopsis con los que presenta similitud únicamente en la región 5' del gen, el resto de los genes *AtBGAL* presentan una estructura muy similar con dos zonas que codifican los dominios *Glyco_hydro_35* y *Glyco_hydro_2_N*. Además, el gen *AtBGAL14* presenta una característica diferencial, la existencia en su zona 3' de un exón extra que codifica un dominio PRN1_N (dominio que aparece en los factores de *splicing* PRP1).

Las 17 β -galactosidasas de arabisopsis (BGAL1 a BGAL17) pertenecen a 8 de las 9 subfamilias en las que se han dividido las β -galactosidasas vegetales (Pérez-Almeida, 2004; Tanthanuch y col., 2008): a1, a2, a4, a5, b, c1, c2 y d (no existe ninguna β -galactosidasas de plantas superiores que pertenezca al grupo a3, exclusivo del musgo *Physcomitrella patens*) (Tanthanuch y col., 2008; Gantulga y col., 2009). El grupo mayoritario es la subfamilia a1 que está formada por 6 miembros (BGAL1, BGAL2, BGAL3, BGAL4, BGAL5, y BGAL12), mientras que el resto de las subfamilias contiene de uno a tres miembros (Tanthanuch y col., 2008; Gantulga y col., 2009).

El estudio de las proteínas codificadas por los 17 genes de arabisopsis permite establecer una serie de características teóricas. Respecto a su tamaño, tienen un PM entre 78 y 112 kDa y una longitud entre 697 y 988 aminoácidos. Esto permite incluir a todas ellas, excepto a BGAL14 (697 aminoácidos) y a BGAL17 (988 aminoácidos), en los 2 grupos de β -galactosidasas determinados en función de su tamaño. Las β -galactosidasas BGAL2, 4, 5, 6, 10 y 12 pertenecen al grupo 1 y tienen entre 721 y 731 aminoácidos y las BGAL1, 3, 7, 8, 9, 11, 13, 15 y 16 al grupo 2 con una longitud entre 832 y 888 aminoácidos, caracterizándose estas últimas por la presencia en su extremo

C-terminal del dominio de unión a carbohidratos similar a las lectinas (King y Davies, 1995; Ahn y col., 2007). Todas las β -galactosidasas de arabis, excepto BGAL14, presentan un péptido señal en su extremo N-terminal aunque en BGAL15 y BGAL17 no se ha podido determinar el punto de ruptura, por lo que no está claro si funciona como tal (Ahn y col., 2007). Otra de las características que puede determinarse teóricamente es el pI, que es generalmente básico (superior a 7.23), excepto los de BGAL14 (6.56) y BGAL15 (5.22). La presencia de un péptido señal y el pI básico en todas las proteínas BGAL, excepto BGAL14, 15 y 17, apuntan a su localización en la pared celular (Ahn y col., 2007) y la posibilidad de estar unidas a las pectinas por enlaces iónicos. Las predicciones bioinformáticas sitúan a doce de ellas en la pared celular, cuatro en el retículo endoplasmático (BGAL3, 5, 11 y 16) y una en el citoplasma (BGAL14), si bien la localización exacta deberá determinarse empíricamente. De hecho, algunos estudios han establecido que las proteínas BGAL2, 4 y 5 se encuentran en la pared celular (Gantulga y col., 2009), lo que en el caso de BGAL5 no coincide con las predicciones bioinformáticas. Finalmente, 12 de las 17 proteínas BGAL presentan entre 1 y 9 sitios de N-glicosilación, lo que indica que puede tratarse de glicoproteínas; las 5 que no presentan sitios de N-glicosilación son BGAL3, 5, 7, 11 y 16 (Ahn y col., 2007).

Los resultados obtenidos en los distintos estudios realizados hasta el momento para determinar los niveles de expresión de los genes que codifican las diferentes β -galactosidasas así como la actividad de sus promotores varían en función de la metodología empleada (Pérez Almeida, 2004; Ahn y col., 2007; Iglesias y col., 2006; Gantulga y col., 2008; 2009; Albornos y col., 2012). Estudios realizados usando RT-PCR (transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa) en hojas, flores, raíces, plántulas verdes y etioladas (Ahn y col., 2007) establecen que los transcritos *AtBGAL1*, *AtBGAL2* y *AtBGAL3* se acumulan de forma constitutiva en los diferentes órganos aunque sus mRNAs son más abundantes en hojas, raíces y flores, mientras que el resto de los transcritos *AtBGAL* tienen una acumulación más específica, lo que indica que podrían participar en diferentes procesos fisiológicos. Así, los transcritos *AtBGAL4* y *AtBGAL5* no se acumulan en plántulas verdes y el resto de los transcritos *AtBGAL* no se detectan ni en plántulas verdes ni etioladas. Según estos estudios, los transcritos *AtBGAL8*, *AtBGAL11*, *AtBGAL13* y *AtBGAL16* se detectan únicamente en flores y el *AtBGAL6* en raíces. Otro grupo de genes, *AtBGAL9*, *AtBGAL10* y *AtBGAL17*, sí presentan transcritos en hojas y flores; los transcritos

AtBGAL7 se acumulan en hojas, flores y raíces y finalmente, los *AtBGAL12*, *AtBGAL14* y *AtBGAL15* no se detectan en los órganos analizados. Por otra parte, resultados obtenidos usando *microarrays* indican que la mayoría de los transcritos *AtBGAL* presentan acumulación constitutiva en todos los tejidos, aunque se observan diferencias notables en diferentes órganos y estados del desarrollo. Además, la utilización de *microarrays* ha permitido determinar que algunos genes *AtBGAL* se inducen por estrés biótico o abiótico, como *AtBGAL1* que se induce por hipoxia, estrés salino o el ataque de patógenos. Estudios más detallados sobre miembros concretos de esta familia de enzimas matizan resultados obtenidos y así, por ejemplo, parece que el gen *AtBGAL12* se expresa en raíces (Gantulga y col., 2009). Además, el estudio de la actividad de los promotores de los genes de la subfamilia a1 de β -galactosidasas muestran que *AtBGAL1*, 2, 3 y 4 exhiben una alta actividad en células y órganos en expansión (Albornos y col., 2012), lo que indicaría una implicación en la remodelación de la pared celular en cotiledones, hojas, botones florales y flores. El promotor *pAtBGAL5*, por el contrario, muestra un patrón muy característico de expresión, ya que se encuentra activo solo en los tricomas a lo largo de todo el desarrollo de la planta. Finalmente, el promotor *pAtBGAL12* fue detectado principalmente en zonas meristemáticas tales como primordios foliares, raíces secundarias emergentes y desarrollo de semillas (Albornos y col., 2012).

Las diferencias encontradas en la acumulación de transcritos y la actividad de los promotores indican que las β -galactosidasas de *arabidopsis* pueden actuar en diferentes funciones o intervenir en el desarrollo concreto de un determinado tejido y/o órgano de tal manera que la actividad β -galactosidasa deba darse de una forma localizada (Gantulga y col., 2009). Actualmente, todavía no se conoce con exactitud la función en el desarrollo de las diferentes β -galactosidasas de *A. thaliana*, si bien se ha propuesto que la BGAL4 pudiera estar relacionada con la movilización de polisacáridos de la pared celular de órganos vegetativos cuando hay déficit de azúcares (Lee y col., 2007) y con la expansión celular durante la germinación del grano de polen junto con BGAL11 y BGAL13 (Hrubá y col., 2005). Otras β -galactosidasas, como BGAL7 y BGAL5, podrían participar en la relajación de la pared asociada con la expansión del polen que se produce tras la mitosis de la microspora (Hrubá y col., 2005). Por otro lado, la BGAL6 está relacionada con el desarrollo de las envueltas seminales favoreciendo la expansión de mucílago en la semilla durante la imbibición de la misma

(Dean y col., 2007; Macquet y col., 2007). Finalmente, estudios realizados con mutantes *knockout* del gen *AtBGAL10* muestran que el producto de este gen actúa sobre el XG (Sampedro y col., 2012). El mutante *bgal10-1* analizado presentó alteraciones fenotípicas, como una reducción del tamaño de los sépalos y de la silicua (Sampedro y col., 2012).

Las β -galactosidasas de la subfamilia a1 pueden actuar sobre sustratos derivados de la pared celular, contribuyendo con su actuación a la dinámica de la misma (Ahn y col., 2007; Tanthanuch y col., 2008; Gantulga y col., 2009). Todas ellas han mostrado un máximo de actividad con el sustrato artificial pNP- β -D-galactopiranosido a un pH entre 4.0-4.5 y en un rango de temperatura entre 40-50°C. Además las 6 isoenzimas son capaces de hidrolizar los enlaces β -(1,4) y β -(1,3) de galactooligosacáridos y tan solo la isoenzima BGAL12 es capaz de hidrolizar los enlaces β -(1,6) (Ahn y col., 2007; Gantulga y col., 2008; 2009). Todos estos tipos de enlaces se encuentran en los polisacáridos pécticos de la pared celular (Zablackis y col., 1995) lo que sugiere que los galactanos pécticos podrían ser el sustrato natural de estas enzimas.

Las tres β -galactosidasas de la subfamilia a1, BGAL2, BGAL4 y BGAL12, en cuyo estudio se ha centrado el trabajo recogido en esta memoria, pertenecen al grupo 1 de β -galactosidasas (Ahn y col., 2007), presentan un pI básico (8.61, 8.88 y 8.04 respectivamente) y un péptido señal que las dirige a la vía de secreción. Tanto los estudios *in silico* como los estudios *in planta* (Lee y col., 2007; Gantulga y col., 2009) localizan a las 3 proteínas en la pared celular. Ninguna de la 3 proteínas presenta en su extremo C-terminal el dominio de unión a carbohidratos similar a las lectinas (Ahn y col., 2007). BGAL2, BGAL4 y BGAL12 son posibles glicoproteínas ya que presentan en su secuencia dominios de N-glicosilación, encontrándose 1 en BGAL2 y en BGAL4, y 3 en BGAL12. No obstante, la proteína recombinante BGAL4 obtenida en un sistema eucariota no sufre glicosilación a diferencia de lo que ocurre con la BGAL12 (Ahn y col., 2007; Gantulga y col., 2009), aunque no se conoce si las proteínas nativas se encuentran glicosiladas en ninguno de los tres casos (BGAL2, BGAL4 y BGAL12). Las proteínas BGAL2 y BGAL12 no experimentan un proceso de proteólisis postraduccional, siendo el tamaño de la proteína madura de aproximadamente 75 KDa (Gantulga y col., 2009), mientras que hasta el momento se desconoce si la proteína BGAL4 sufre este procesamiento.

La expresión de estas proteínas en un sistema heterólogo eucariota ha permitido determinar ciertas características de su actividad enzimática, que en el caso de la BGAL2, coinciden con las determinadas para la proteína nativa (Gantulga y col., 2009). Así, las 3 proteínas presentan un pH óptimo ácido entre 4.0 y 4.5 y una temperatura óptima de 40°C. Tanto BGAL2, como BGAL4 y BGAL12 pueden hidrolizar, con diferentes eficiencias, la galactosa de un amplio rango de sustratos de forma independiente al aglicón, aunque son muy específicas con respecto al azúcar que liberan ya que solo son capaces de hidrolizar β -D-galactopiranosido y, en menor medida, su análogo 6-deoxy, el fucopiranosido. Esto indica que hidrolizan los azúcares con un grupo hidroxilo en las posiciones C3 y C4 de la molécula (Gantulga y col., 2009) y que los carbonos C4 y C6 de la galactosa son importantes para la unión al sustrato y la catálisis realizada por estas enzimas (Ahn y col., 2007).

Como ya se ha mencionado, BGAL2, BGAL4 y BGAL12 son capaces de hidrolizar enlaces β -(1,3) y β -(1,4) y además BGAL12 puede romper enlaces β -(1,6) (Ahn y col., 2007; Gantulga y col., 2008; 2009). Estas enzimas hidrolizan galactanos purificados con enlace β -(1,4) siendo BGAL4 más efectiva que BGAL12 y BGAL2. La actividad de estas enzimas frente a las diferentes fracciones en que se subdivide la pared celular no es muy alta y ninguna de ellas es capaz de hidrolizar fracciones hemicelulósicas. De hecho, BGAL2 y BGAL4 solo son capaces de actuar sobre la fracción péctica extraída con oxalato con una efectividad 4 y 5 veces menor, respectivamente, que cuando se usan los galactanos purificados (Gantulga y col., 2008; 2009), mientras que BGAL12 actúa ligeramente sobre las dos fracciones pécticas, aunque con más efectividad sobre la fracción extraída con agua caliente (Gantulga y col., 2009). Estos resultados llevaron a Gantulga y col. (2009) a proponer que estas enzimas presentan actividad exo-galactanásica y que, posiblemente, sus sustratos en la pared celular sean en RGI y el RGII, polisacáridos pécticos ricos en galactanos.

Como con el resto de genes que codifican β -galactosidasas de arabidopsis, los resultados obtenidos de diferentes estudios sobre los niveles de transcritos de los genes *AtBGAL2*, *AtBGAL4* y *AtBGAL12* no son siempre coincidentes. En muchas ocasiones también se observan discrepancias entre los estudios de acumulación de transcritos y de proteínas que pueden ser debidas a que los procesos postranscripcionales y postraduccionales contribuyen de manera importante a la regulación de la actividad de estas enzimas (Gantulga y col., 2009).

Todavía no se ha determinado que función pueden tener las proteínas BGAL2, BGAL4 y BGAL12 en la fisiología de la planta, aunque al igual que otros miembros de la subfamilia a1, parecen desempeñar funciones importantes en la remodelación de la pared celular durante el crecimiento y desarrollo vegetal (Gantulga y col., 2009) y algunos autores proponen que la función de BGAL12 está relacionada con el proceso de crecimiento (Gantulga y col., 2009). Como se ha dicho anteriormente, la BGAL4 podría estar relacionada con la movilización de polisacáridos de la pared celular en condiciones de déficit de azúcares (Lee y col., 2007) y con la expansión celular durante la germinación del grano de polen junto con BGAL11 y BGAL13 (Hrubá y col., 2005). Los datos de coexpresión génica (base de datos ATTED II, <http://atted.jp/>) muestran que *AtBGAL2*, *AtBGAL4* y *AtBGAL12* coexpresan con genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo de la pared celular, como poligalacturonasas, XTHs, β -xilosidasas o β -arabinosidasas, lo que podría indicar que todas actúan coordinadamente en la modificación de los azúcares de la misma.

3. Planteamiento de trabajo

La presencia de familias génicas de β -galactosidasas en plantas indica la existencia de numerosas isoformas producidas de forma diferencial en diferentes órganos y/o momentos del desarrollo de la planta, por lo que pueden presentar funciones específicas, desconocidas hasta el momento.

La mayoría de las β -galactosidasas vegetales actúan en la remodelación de la pared celular en diferentes procesos fisiológicos, si bien el sustrato específico de cada una de ellas en esta estructura y su función en el desarrollo de la planta no están claros. En este proyecto vamos a trabajar con 3 β -galactosidasas de arabisidopsis, codificadas por genes de la subfamilia a1 (*AtBGAL2*, *AtBGAL4* y *AtBGAL12*) y 2 β -galactosidasas de garbanzo β III-Gal y β IV-Gal con un alto grado de similitud de secuencia entre ellas y que pueden ser ortólogos funcionales de las 3 β -galactosidasas de arabisidopsis. Con los datos que se tienen hasta el momento, nuestra hipótesis de trabajo es que estas β -galactosidasas actúan sobre las pectinas de la pared celular y que podrían estar implicadas en procesos de relajación y/o endurecimiento de la misma. Así pues, el objetivo final de este trabajo es determinar la función de las β -galactosidasas seleccionadas en el desarrollo de la planta, comprobando cómo actúan en la pared celular y qué variaciones sufren las plantas, tanto en su morfología como en la

estructura y composición de sus paredes celulares, cuando estas β -galactosidasas no se producen (mutantes nulos) o cuando se encuentran en exceso (plantas transgénicas en las que se encuentran sobreexpresadas).

El objetivo general se ha dividido en 2 grandes objetivos específicos:

1. Estudiar la función de dos β -galactosidasas de *Cicer arietinum*: β III-Gal y β IV-Gal, enfocándolo en los siguientes objetivos concretos:
 - a. Obtener plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresen los genes *CanBGal-3* y *CanBGal-4* de garbanzo, que codifican las proteínas β III-Gal y β IV-Gal, respectivamente.
 - b. Determinar las variaciones morfológicas que provoca la producción de las proteínas β III-Gal y β IV-Gal de garbanzo en plantas transgénicas de arabis.
 - c. Analizar los cambios en las proteínas de la pared celular de las plantas transgénicas antes mencionadas, determinando las actividades β -galactosidásica y β -galactanásica.
 - d. Comprobar la capacidad autohidrolítica de las paredes celulares de las plantas transgénicas obtenidas en el apartado 1a para determinar si la β III-Gal y β IV-Gal de garbanzo son capaces de hidrolizar las paredes celulares de arabis y que azúcares se liberan.
 - e. Estudiar las modificaciones en la composición y estructura de la pared celular de las plantas transgénicas objeto de estudio, determinando su composición en azúcares neutros por cromatografía de gases, los principales polisacáridos y los enlaces que los unen utilizando la espectroscopía FTIR, así como analizar la posible reducción de cadenas laterales de galactano *in situ* mediante la técnica de inmunolocalización con anticuerpos específicos.
2. Estudiar la función de las β -galactosidasas de la subfamilia a1 de arabis, centrándonos en 3 de ellas AtBGAL2, AtBGAL4 y AtBGAL12, con los siguientes objetivos específicos:
 - a. Analizar la acumulación diferencial de sus transcritos a lo largo del desarrollo de la planta, ampliando este objetivo a los seis miembros de la subfamilia a1.
 - b. Estudiar las modificaciones fenotípicas tanto morfológicas como de composición de la pared celular, que provoca la pérdida de función de los genes

AtBGAL2, *AtBGAL4* y *AtBGAL12* mediante el uso de mutantes *knockout*, tal y como se indica en los apartados 1b a 1d.

Resultados y Discusión

Capítulo I: Análisis funcional de las proteínas β III-Gal y β IV-Gal de *Cicer arietinum*

Resultados

1. Construcción y análisis de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan las proteínas β III-Gal y β IV-Gal de *Cicer arietinum*

Se construyeron plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan las ORFs de los genes *CanBGal-3* y *CanBGal-4* de *C. arietinum*, que codifican respectivamente las proteínas β III-Gal y β IV-Gal bajo el control del promotor fuerte y constitutivo del gen 35S del CaMV (*p35S*). Para ello las ORFs que codifican las proteínas β III-Gal y β IV-Gal se amplificaron incluyendo el codón de terminación y los sitios de recombinación *attB* para llevar a cabo la recombinación BP y obtener el vector de entrada, utilizando como vector donador el pDONR201. A continuación las ORFs *CanBGal-3* y *CanBGal-4* se transfirieron por medio de recombinación LR al vector de destino (el pGWB2, que permite obtener la proteína nativa bajo el control del *p35S*), generando así los vectores de expresión. (pGWB2.CanBGal-3 y pGWB2.CanBGal-4), que se utilizaron para transformar por electroporación la cepa C58C1m de *A. tumefaciens* y continuar con el proceso de obtención de plantas transgénicas. La transformación de las plantas de *A. thaliana* se realizó infiltrando 3 macetas con los cultivos de las agrobacterias que contenían los plásmidos pGWB2.CanBGal-3 y pGWB2.CanBGal-4, según se indica en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. Las plantas de *A. thaliana* infiltradas (T_0) se crecieron hasta la producción de semillas (T_1) y se denominaron 35S:: β III-Gal y 35S:: β IV-Gal. Cada una de estas líneas T_1 se sembró en tierra para obtener semillas T_2 . Las plantas obtenidas a partir de estas semillas se utilizaron para los posteriores ensayos recogidos en esta memoria.

En primer lugar se determinó por Southern blot el número de inserciones del (apartado 4.8 de Materiales y Métodos). Las líneas transgénicas más interesantes desde el punto de vista de los estudios fenotípicos fueron las 35S:: β III-Gal 1.10, 2.3 y 3.1, y las 35S:: β IV-Gal 1.2, 1.4, 3.5 y 3.8, ya que presentaron una única inserción, mientras

que otras 9 líneas en total, presentaron dos inserciones (35S:: β III-Gal 1.6, 3.3 y 3.7 y 35S:: β IV-Gal 1.1, 1.3, 1.8, 2.8, 2.9 y 3.6). Para realizar los análisis de expresión del transgén (apartado 2.3 de este capítulo) se utilizaron las líneas de una única inserción, así como las líneas 35S:: β III-Gal 1.6, 3.3 y 3.7 y 35S:: β IV-Gal 1.3, por si los niveles de transcrito detectados en las de una única inserción fuesen demasiado bajos.

Para llevar a cabo una estimación de la acumulación de transcritos de los transgenes *CanBGal-3* y *CanBGal-4* en las plantas transgénicas 35S:: β III-Gal y 35S:: β IV-Gal utilizamos una aproximación por sqRT-PCR utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA total de plantas de arabis de 10 días del tipo silvestre y de las líneas transgénicas de inserción única seleccionadas como homocigóticas (apartado 4.4 de Materiales y Métodos). Los análisis de los niveles de transcritos nos llevaron a seleccionar las líneas 1.10.5 en 35S:: β III-Gal y 3.8.4 en 35S:: β IV-Gal, por ser las líneas que en el Southern blot indicaba claramente la inserción única del transgén en ambos casos.

2. Caracterización fenotípica de las plantas 35S:: β III-Gal

Una vez seleccionada la línea transgénica 35S:: β III-Gal, procedimos con la caracterización fenotípica de las plantas obtenidas. Para ello se realizó un estudio comparativo con plantas de tipo silvestre (WT), tanto a nivel morfológico como de composición y estructura de sus paredes celulares, lo que nos permitirá comprobar si la enzima β III-Gal sobreexpresada en arabis es capaz de modificar su pared celular y actuar sobre el componente polisacárido de las paredes de esta especie.

En primer lugar se realizó una comparación morfológica a lo largo del desarrollo de plántulas y plantas WT y de la línea transgénica 35S:: β III-Gal. En los estadios tempranos del desarrollo (plántulas de 3, 5, 7 y 10 días, tanto etioladas, como crecidas en luz) se puede apreciar como la línea transgénica presentó un menor tamaño respecto al WT, lo que se refleja igualmente en el peso fresco y el peso seco, siendo menor en la línea transgénica. Respecto a la roseta, se pudo establecer que el número de hojas a lo largo del desarrollo fue el mismo en la línea 35S:: β III-Gal y en el WT, aunque el diámetro de la misma fue inferior en la línea transgénica respecto al WT. Si atendemos al momento en el que ocurre la emergencia del tallo floral, se observó un ligero retraso en las plantas 35S:: β III-Gal, con un porcentaje de emergencia a los 22 días del 70% frente al 86% del WT. Las diferencias en la longitud del tallo floral fueron poco

acusadas, aunque fue ligeramente inferior en la línea 35S:: β III-Gal respecto al WT y más acusada en los momentos de máximo crecimiento.

A continuación se procedió al estudio de los extractos proteicos obtenidos a partir de las paredes celulares de las plántulas de 10 días pertenecientes a la línea transgénica 35S:: β III-Gal y al WT, analizando la cantidad de proteínas y las actividades β -galactosidásica y β -galactanásica. La cantidad de pared celular obtenida a partir de la línea transgénica 35S:: β III-Gal y del tipo silvestre y la cantidad de proteína por mg de pared celular, no parecen guardar relación con la presencia del transgén. Tampoco podemos establecer una relación directa entre la presencia del transgén y las actividades β -galactosidásica y β -galactanásica, con sólo pequeñas variaciones entre la línea transgénica y en el WT.

La β III-Gal de *C. arietinum* es la enzima responsable del proceso autolítico observado en las paredes celulares de plántulas de esta especie (Dopico y col., 1989; 1991), por lo que quisimos establecer, por una parte, si las paredes celulares de plantas de arabidopsis presentan autólisis enzimática y, por otra, si la sobreproducción de la β III-Gal influye en la misma, utilizando para ello paredes celulares de plántulas WT y 35S:: β III-Gal de 10 días. Los resultados obtenidos indicaron una liberación de azúcares en las paredes celulares de plantas WT muy similar en cantidad a las que presenta la línea transgénica 35S:: β III-Gal, muy superiores a los obtenidos en los correspondientes controles, lo que indica que las paredes celulares de arabidopsis presentan capacidad autohidrolítica y que la sobreproducción de la β III-Gal no influye en la cantidad de azúcares totales liberados. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en la cantidad de azúcares reductores liberados, con valores mayores en la línea transgénica que en el WT. El perfil de azúcares neutros (analizado por cromatografía en fase gaseosa) fue muy similar entre la línea 35S:: β III-Gal y del WT y únicamente se observaron ligeras fluctuaciones. En ambos casos, la galactosa fue el azúcar liberado en mayor proporción, seguido de arabinosa, y glucosa.

Se procedió a continuación a la caracterización de las paredes celulares, comenzando por el análisis de la composición en azúcares neutros de la fracción no celulósica de la pared celular de plántulas de 10. La única diferencia estadísticamente significativa entre la línea transgénica 35S:: β III-Gal y en el WT se observó en la galactosa, que como hemos comentado anteriormente, es el azúcar hidrolizado principalmente por la β III-Gal. Sorprende sin embargo, que el porcentaje de este azúcar

fue mayor en las paredes celulares de la línea transgénica que en las correspondientes al WT.

Una vez realizado este análisis decidimos analizar mediante espectroscopía FTIR las paredes celulares la línea transgénica 35S:: β III-Gal y del WT. En un principio se analizaron las paredes celulares obtenidas de plántulas de 10 días crecidas en condiciones de día largo, aunque este análisis nos permitió establecer diferencias entre la línea 35S:: β III-Gal y el WT. Por este motivo, se decidió estudiar las paredes celulares de plántulas de 3 días mediante el análisis del residuo insoluble en alcohol (AIR). En este caso el análisis de componentes principales (PCs) de los espectros obtenidos, sí permitió establecer diferencias entre el tipo silvestre y la línea transgénica, que apuntan a una mayor representación de polisacáridos pécticos, restos de ácido galacturónico y xiloglucano en las plántulas transgénicas y de glucomanano residuos galactosil y residuos ramnosil en el WT.

Los resultados de la caracterización morfológica de las plantas transgénicas 35S:: β III-Gal mostraron diferencias con el WT tanto a nivel del tallo floral como de las hojas de la roseta. Así, decidimos realizar cortes histológicos de estos órganos para comprobar posibles cambios anatómicos a nivel tisular y llevar a cabo estudios de inmunolocalización utilizando anticuerpos específicos frente a galactano (LM5) y homogalacturonano (LM18). El estudio se llevó a cabo sobre cortes transversales del primer y tercer entrenudo de plantas de entre 28 y 32 días y cortes transversales del 2º par de hojas de roseta de plantas de 17 días (aún en expansión). Respecto a la distribución del marcaje con el anticuerpo LM5 en el tallo de plantas WT, pudimos ver que la intensidad del mismo desciende a medida que aumenta el estado de desarrollo de los tejidos. En las plantas 35S:: β III-Gal se observa una distribución del galactano similar a la encontrada en el WT, aunque con una leve diferencia en la intensidad del marcaje en el entrenudo más basal, en concreto en el tejido cambial y en las células del parénquima cortical. En las hojas, la intensidad del marcaje con el LM5 en plantas 35S:: β III-Gal fue menor que la del WT, siendo esta reducción más evidente en la epidermis y las células del mesófilo. Por otra parte, la intensidad del marcaje obtenido con el LM18 en la línea transgénica 35S:: β III-Gal fue notablemente mayor que en el WT, a excepción de los tejidos vasculares, que presentaron un marcaje muy tenue, comparable al encontrado en el tipo silvestre.

3. Análisis fenotípico de las plantas 35S:: β IV-Gal

Al igual que en las plantas 35S:: β III-Gal, procedimos con la caracterización de las plantas obtenidas. Tras realizar un estudio comparativo a nivel morfológico con plantas de tipo silvestre no fue posible detectar cambios en ninguno de los órganos ni estados de desarrollo analizados (datos no mostrados), lo que nos llevó a realizar una primera caracterización de las paredes celulares mediante espectroscopia FTIR y un estudio de localización de galactano en órganos con distinta capacidad de elongación, como primera aproximación a la caracterización fenotípica de las plantas.

En un principio se procedió con el análisis de las paredes celulares obtenidas a partir de plántulas de 10 días crecidas en condiciones de día largo, aunque ni el perfil de los espectros de absorción obtenido a partir de estas paredes, ni el análisis de PCs nos permitió establecer diferencias entre la línea 35S:: β IV-Gal y el WT. Por este motivo, decidimos estudiar las paredes celulares de plántulas de 3 días, crecidas tanto en condiciones de día largo como en oscuridad, analizando el AIR, aunque este análisis tampoco permitió establecer diferencias entre las paredes celulares de las plantas 35S:: β IV-Gal que se puedan relacionar con la presencia del transgén, al menos en estas condiciones y estados de desarrollo.

Se estudio mediante análisis de inmunodetección con el anticuerpo LM5 la presencia del polisacárido β -(1,4)-galactano y los posibles cambios en la línea transgénica respecto al WT, utilizando para ello el mismo material utilizado en las plantas 35S:: β III-Gal, entrenudos (1° y 3°) y hojas de roseta, ya que es representativo de distintas capacidades de elongación y de distintos tipos celulares.

Los resultados obtenidos tampoco permiten establecer diferencias entre las plantas WT y las 35S:: β IV-Gal. Sí se observó en estas plantas la misma especificidad de marcaje en función de los diferentes tipos celulares descrita anteriormente para este anticuerpo, así como la gradación en la intensidad de la señal en función del estado de desarrollo, aunque los niveles de galactano tanto en los entrenudos como en las hojas no presentaron variaciones significativas.

Discusión

En el presente trabajo nos propusimos producir dos de estas enzimas, β III-Gal y β IV-Gal, en plantas de arabidopsis, con objeto de analizar su capacidad hidrolítica sobre

las paredes celulares en esta especie. El hecho de que estas dos enzimas se hayan relacionado con procesos tan dispares como el crecimiento y la autólisis (β III-Gal) y el endurecimiento de la pared celular en el cese de la elongación (β IV-Gal), nos hizo pensar que los cambios fenotípicos observados, en caso de que los haya, nos ayudarían a profundizar, no sólo en la función de estas proteínas en el desarrollo de la planta, sino también en las funciones en este proceso de los polisacáridos por ellas hidrolizados.

Comenzamos en primer lugar analizando las plantas 35S:: β III-Gal. Una vez seleccionada una línea transgénica con altos niveles de transcrito y de una única inserción, comenzamos la caracterización fenotípica de las plantas mediante un estudio morfológico que nos permitiese detectar cambios en diferentes etapas del desarrollo (tanto en plántulas como en plantas adultas) y en los diferentes órganos.

Los resultados pusieron de manifiesto que la producción en arabis de la β III-Gal sí produce cambios visibles (figuras 11 a 18), que si bien en ningún caso suponen una alteración drástica de la morfología de la planta ni la aparición de un fenotipo severo, todos ellos están relacionados con una disminución del crecimiento en diferentes fases del desarrollo.

Así, se observó una disminución en el tamaño de las plántulas en todos los estados estudiados, tanto en luz como en oscuridad (figuras 11 y 12) y que se tradujo a su vez en una disminución del peso seco y peso fresco (figura 13). Igualmente, se detectó una disminución en el diámetro de la roseta (figuras 14 y 15) y en el tamaño del tallo floral, aunque en este caso poco acusada y únicamente durante la fase de mayor elongación de este órgano (figuras 17 y 18). Estos cambios morfológicos podrían apuntar a que la acción de la β III-Gal sobre las cadenas laterales de la fracción péctica de la pared celular está produciendo la compactación de la misma, contribuyendo de esta forma a un descenso en la tasa de elongación.

No sorprende, sin embargo, la ausencia de un fenotipo más severo en las plantas estudiadas. Trabajos similares muestran que la sobreexpresión de la β III-Gal de garbanzo en tubérculos de patata, que produjo un descenso en el contenido de galactosa en las cadenas laterales de galactano de hasta un 50% (Martín y col., 2005), o la expresión de una endogalactanásica fúngica en este mismo sistema vegetal, que produjo una reducción del galactano de hasta un 70% (Sorensen y col., 2000), no se tradujeron en una alteración fenotípica en los tubérculos. De igual forma, mutantes de arabis

deficientes en una β -(1,4)-galactan β -(1,4)-galactosiltransferasa, que presentaban una reducción de galactosa de un 28%, no mostraron ninguna alteración morfológica (Liwanag y col., 2012), mientras que la sobreexpresión de una endo β -(1,4)-galactanasa fúngica en esta misma planta, con un marcado descenso en las cadenas laterales de galactano, sólo produjo un ligero retraso en la elongación del tallo floral (igualmente observado en las plantas 35S:: β III-Gal, figura 16) y una reducción en el diámetro del mismo, sin que su longitud final se viese alterada (Obro y col., 2009).

Los cambios morfológicos observados, podrían indicar cambios en las paredes celulares de la línea transgénica, por lo que analizamos las paredes celulares, comenzando nuestro análisis en plantas de 10 días crecidas en condiciones de luz.

Las cantidades de pared celular y proteína no reflejaron diferencias significativas entre la línea transgénica y el tipo silvestre (tabla 2), lo que indicaría que la expresión de un único transgén no estaría produciendo cambios detectables en estos parámetros ni alterando las paredes de forma que se produzca un aumento de la extractabilidad de las proteínas unidas a las mismas, ni tampoco en los niveles de actividad β -galactosidásica y β -galactanásica (figura 19).

Como se ha indicado anteriormente, la β III-Gal es la enzima responsable del proceso de autólisis de las paredes celulares de epicotilos de garbanzo (Dopico y col., 1989; 1991), y actúa sobre las pectinas de la pared, en concreto sobre el arabinogalactano unido al RG-I (Dopico y col., 1990a; b). La autólisis se define como un proceso de autodegradación enzimática de la pared celular que podría reflejar las interacciones enzimáticas que ocurren durante el proceso de relajación de la pared celular previo al crecimiento en extensión o en otros procesos del desarrollo que requieren degradación de la pared celular. Ha sido estudiada por diferentes autores en numerosos sistemas vegetales, como fibras de algodón (Bucheli y col., 1987), coleoptilos de arroz (Labrador y Nicolás, 1982) y de maíz (Labrador y Nevins, 1989), epicotilos de guisante (Labrador y Nicolás, 1985; Dopico y col., 1986), raíces de judía (Wehr y col., 2004) o frutos de tomate (Rushing y Hubber, 1987; Chun y Huber, 1998), aunque hasta el momento, no existe ningún estudio sobre este proceso en *A. thaliana*. Por tanto, era necesario en primer lugar establecer si se produce autólisis en las paredes celulares de arábido y posteriormente establecer si la sobreproducción de la β III-Gal afecta a este proceso.

Pudimos confirmar que las paredes celulares de plántulas de 10 días de *arabidopsis* presentan capacidad autohidrolítica (figura 20) y que éste es un proceso enzimático en el que se libera principalmente galactosa y arabinosa (figura 21), tal y como ocurre en las paredes celulares de garbanzo (Dopico y col., 1989), lo que podría indicar la implicación de alguna de las β -galactosidasas en la autólisis de las paredes celulares de *arabidopsis*.

Sin embargo, las paredes celulares de la línea transgénica 35S:: β III-Gal no muestran diferencias con el tipo silvestre en el proceso autolítico, más allá de un ligero incremento en el porcentaje de azúcares reductores liberados (figura 20), siendo los perfiles de liberación de azúcares neutros prácticamente iguales. Esto podría deberse a que la propia remodelación de las paredes celulares durante el crecimiento de las plántulas de *arabidopsis* estén limitando la disponibilidad de sustrato de la β III-Gal o incluso su acceso a las pectinas de estas paredes. Esto se ve apoyado por el hecho previamente observado de que la β III-Gal purificada de epicotilos de garbanzo de cuatro días, momento en el que la autólisis y la tasa de crecimiento son máximas, es incapaz de hidrolizar la pared celular de epicotilos de más edad con la misma eficacia que lo hace sobre paredes celulares de epicotilos jóvenes (Dopico y col., 1991), lo que unido al hecho de que el contenido en galactosa de las paredes celulares de los epicotilos decrece a lo largo del crecimiento de los mismos (Muñoz y col., 1993), indica que los cambios en la pared celular de plántulas de 10 días impedirían observar cambios en el proceso de autólisis.

Al analizar la composición en azúcares neutros de las paredes celulares de plántulas de 10 días, sorprende que el porcentaje de galactosa sea superior en la línea transgénica 35S:: β III-Gal que en el WT (figura 22), cuando lo que se esperaba era una reducción de las cadenas de galactano de la fracción péctica, aunque este aumento de galactosa no pudo detectarse mediante espectroscopia FTIR. Dado que se ha descrito la actuación de la β III Gal en la pérdida de galactosa durante la elongación de los epicotilos (Martín y col., 2013) y que los cambios morfológicos apuntaban a una implicación de la β III-Gal expresada en *arabidopsis* con la pérdida de galactosa a lo largo del crecimiento, nos propusimos analizar los cambios en la pared celular en un material en el que la tasa de elongación fuese más acusada, como es el caso de plántulas de 3 días, esperando que los cambios fuesen más evidentes en este material.

En estas plantas sí se pudieron detectar cambios importantes en los perfiles de los espectros FTIR, que apuntan a un menor contenido en restos galactosil en las plantas 35S:: β III-Gal en comparación con el tipo silvestre, aunque quizás los resultados más llamativos sean los que apuntan a una mayor representación polisacáridos pécticos, ácido galacturónico y xiloglucano (XG) en estas paredes celulares (figuras 25 y 26).

Como hemos comentado anteriormente, la reducción en las cadenas laterales de galactano en tubérculos de patata por la sobreexpresión de la β III-Gal (Martín y col., 2005) o de una endogalactanásica fúngica (Sorensen y col., 2000), no se traduce en una alteración fenotípica en los tubérculos, aunque se observa un incremento del homogalacturonano (HGA) en el primero de los casos y del contenido en ácido galacturónico del ramnogalacturonano I (RGI) en el segundo, lo que indica que el aumento en el contenido de estos azúcares contrarresta el posible efecto que pudiera tener la reducción de galactano en la pared celular. Este marcado mecanismo de compensación tan conservado indica a su vez un papel clave de las pectinas, y en concreto de las cadenas laterales de galactano, en las propiedades mecánicas de la pared celular. Diversos estudios han relacionado al galactano con la capacidad de elongación de la pared celular. Así, se ha demostrado su implicación directa en la elongación, controlando la porosidad de la pared celular o sus propiedades viscoelásticas (McCartney y col., 2000; 2003; Ha y col., 2005). Los modelos más recientes de organización de los distintos polisacáridos en la pared celular señalan una interacción directa de las pectinas con el xiloglucano (Marcus y col., 2008; White y col., 2014), así como de las cadenas laterales de arabinano y galactano con las microfibrillas de celulosa (Zykwinska y col., 2007). Por lo tanto, la reducción de restos galactosil y el aumento del contenido en ácido galacturónico y xiloglucano detectado mediante espectroscopia FTIR, podrían estar indicando una alteración de las propiedades mecánicas de la pared celular en las plantas 35S:: β III-Gal que explicaría la reducción del crecimiento observada en las mismas.

Teniendo en cuenta los datos que apuntan a que las cadenas laterales de los polisacáridos pécticos pueden tener una interacción directa, no sólo con la celulosa sino también con el XG (White y col., 2014), y considerando el mayor contenido en XG, y HGA en la línea transgénica (figuras 25 y 26) al que apuntan los resultados de FTIR en plantulas de 3 días, cuyas paredes celulares fueron preparadas a partir del AIR, puede que el mayor porcentaje de galactosa detectado en las paredes celulares de plántulas

35S:: β III-Gal de 10 días se deba a una mayor insolubilización de las cadenas de galactano durante el método de extracción utilizado, por su interacción directa con la fracción hemicelulósica de la pared celular, aumentada en la línea transgénica. De hecho, estudios recientes han demostrado la alta solubilidad en soluciones acuosas de las pectinas (Franková y Fry, 2015), que es especialmente marcada en arabidopsis (J.P. Knox, comunicación personal).

La reducción en los restos galactosil y la compensación por otros polisacáridos pécticos a la que apuntaban los datos de espectroscopia FTIR, se comprobaron *in muro* por técnicas de inmunomarcaje con anticuerpos específicos de galactano (LM5) y de homogalacturonano (LM18) sobre cortes histológicos de tallos florales y hojas de roseta, dos de los órganos en los que detectamos la reducción del crecimiento comentada anteriormente.

En los dos entrenudos del tallo floral analizados hemos podido constatar que se produce una pérdida de galactano a medida que disminuye la capacidad de elongación, observando que la intensidad del marcateje con el anticuerpo LM5 desciende en las plantas WT a medida que aumenta el estado de desarrollo de los tejidos, con un marcateje fuerte y homogéneo en el tercer entrenudo y más tenue en el entrenudo más basal (figura 27). Martín y col. (2013) observaron esta misma reducción en el marcateje con el anticuerpo LM5 a lo largo del crecimiento de tallos de garbanzo. También en tallos de alfalfa se ha observado una disminución del contenido en polisacáridos pécticos a medida que los entrenudos se desarrollan y se va produciendo la completa diferenciación de los distintos tejidos (Vallet y col., 1998). Jung y Engels (2002) encontraron que se produce una reducción del contenido en galactosa de la pared celular en los entrenudos más viejos de tallos de alfalfa con respecto a los jóvenes. Una degradación similar de cadenas de galactano durante el proceso de crecimiento se ha observado en epicotilos de guisante (Labavitch y Ray 1974), calabaza (Sakurai y col., 1987) o hipocotilos de *V. angularis* (Nishitani y Masuda 1981). De igual forma, durante el crecimiento de los hipocotilos de *Vigna radiata* se ha descrito la sustitución de cadenas de galactano altamente ramificadas por cadenas más cortas de este polímero (Herve du Penhoat y col., 1987).

En las plantas 35S:: β III-Gal se observa una reducción en el marcateje con el anticuerpo LM5 muy evidente en el entrenudo más basal y sobre todo en las hojas de la

roseta (figura 27), aún en fase de expansión, lo que nos indica que la β III-Gal es capaz de hidrolizar su sustrato en las paredes celulares de arabidopsis. Se observan además diferencias en tipos celulares concretos, como una mayor reducción en el tejido cambial y en las células del parénquima cortical del entrenudo basal, o en la epidermis y las células del mesófilo de las hojas, lo que apoya que la propia estructura de la pared celular, muy variable entre estos tipos celulares, está regulando la acción de la β III-Gal.

Si atendemos a la distribución del marcaje con el anticuerpo LM18, específico de homogalacturonano (figura 28), podemos afirmar que se ha producido un fuerte incremento de este polisacárido péctico en las plantas 35S:: β III-Gal, tanto en las hojas como en el tallo floral. Teniendo en cuenta los resultados de espectroscopía FTIR y de los experimentos de inmunomarcaje, es evidente que se ha producido una reducción de las cadenas laterales de galactano en las paredes celulares que se ha visto compensada por un marcado aumento en homogalacturonano y, a falta de una confirmación *in muro*, en xiloglucano, lo que nos permite atribuir al galactano un papel clave en el mantenimiento de la correcta arquitectura de la pared celular en arabidopsis. Así, la ausencia de un fenotipo de crecimiento más severo y de cambios morfológicos a nivel tisular en las plantas analizadas se puede explicar por este fenómeno de compensación en las paredes celulares, en las que el papel estructural del galactano controlando el grado de porosidad de la misma y por lo tanto la accesibilidad de las enzimas que controlan el crecimiento (Konno y col., 1986b; Dopico y col., 1990b; McCartney y col., 2000), o sus propiedades viscoelásticas, sería suplido por el incremento en estos otros polímeros.

El papel del homogalacturonano en las propiedades mecánicas y la extensión de la pared celular ha sido ampliamente documentado (Willats y col., 2001; Derbyshire y col., 2007; Röckel y col., 2008). Peaucelle y col. (2008) establecen que las pectinas son un punto de control clave para el correcto desarrollo de los órganos en el meristemo apical de arabidopsis, especialmente condicionado por el HGA y su grado de metil-esterificación. Teniendo en cuenta que las plantas 35S:: β III-Gal presentan un aumento en los niveles de HGA, el retraso en la aparición del tallo floral de estas plantas podría deberse a una alteración de las propiedades mecánicas de la pared celular, si no suficientes para inhibir la emergencia del tallo floral, sí lo bastante fuertes como para producir un retraso en la misma. De igual forma, el aumento en HGA podría ser responsable, junto con el posible incremento en xiloglucano, del descenso en la tasa de

elongación en los distintos órganos estudiados, ya que tanto el XG como el HGA están implicados en el aumento de la resistencia mecánica de la pared celular (Cavalier y col., 2008; Derbyshire y col., 2007). Todo ello confirma que las modificaciones de las pectinas, y en concreto de las cadenas laterales de galactano de la pared celular, son un punto clave en el control de la elasticidad de la misma, y por lo tanto de los procesos de crecimiento y diferenciación a lo largo de la vida de la planta.

Al contrario de lo que ocurre en las plantas β III-Gal, las plantas 35S:: β IV-Gal no presentan ningún cambio fenotípico, ni en su morfología ni en sus paredes celulares, a pesar de haber seleccionado una línea con altos niveles de expresión del transgén.

Como se ha comentado en el caso de la β III-Gal, la acción de una enzima puede estar condicionada por diferentes factores, como la propia estructura de la pared celular en determinados tipos celulares o en momentos concretos, lo que puede impedir el acceso a su sustrato. Sin embargo, esta hipótesis no parece muy probable debido al amplio rango de órganos y estados de desarrollo analizados en las plantas transgénicas 35S:: β IV-Gal. Por otra parte, se podría dar el caso de que los cambios producidos por la β IV-Gal estuvieran limitados a ciertos tipos celulares que produjesen alteraciones fenotípicas no detectables con las técnicas de análisis utilizadas, o que quedasen enmascaradas por la propia estructura de la pared celular.

A pesar del alto grado de homología entre las proteínas β III-Gal y β IV-Gal (un 81%), existen marcadas diferencias entre ellas, como en los puntos isoeléctricos (8.06 y 5.79, respectivamente) o en el número de sitios de N-glicosilación, uno en β III-Gal y cuatro en el caso de β IV-Gal (Esteban y col., 2005). Así, estas características diferenciales podrían estar condicionando las propiedades enzimáticas de la β IV-Gal, como la especificidad de su sustrato. De hecho, en trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación se ha observado que las proteínas β I-Gal y β IV-Gal presentan un patrón de actuación muy parecido, relacionado en ambos casos con el cese de la elongación y el endurecimiento de la pared celular, aunque con ligeras diferencias en determinados tejidos y momentos del desarrollo que se han atribuido en parte a las diferencias en la estructura y características de ambas proteínas (Martín y col., 2008; 2011). Así, el hecho de que no observemos alteraciones fenotípicas en las plantas 35S:: β IV-Gal y sí en las 35S:: β III-Gal, a pesar de que la expresión de ambas proteínas está controlada por el mismo promotor en ambos casos, podría estar condicionado por

estas diferencias anteriormente comentadas, que podrían determinar diferencias a nivel de sustrato entre β III-Gal y β IV-Gal o incluso la actuación en tipos celulares concretos, lo que a su vez indicaría la necesidad de aplicar otras técnicas de estudio más sensibles enfocadas a la detección de modificaciones de la pared celular más específicas.

Capítulo II: Análisis funcional de la subfamilia a1 de β -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*

Resultados

1. Variaciones en los niveles de transcrito de los genes *AtBGAL* de la subfamilia a1 de *A. thaliana*

Los diferentes miembros de la subfamilia a1 de β -galactosidasas de *Arabidopsis* podrían estar desempeñando funciones específicas a lo largo de la vida de la planta, por lo que se decidió analizar los niveles de transcritos *AtBGAL* en diferentes momentos del desarrollo y en distintos órganos por sqRT-PCR, tal y como se indica en el apartado 4.5.4 de Materiales y Métodos.

En primer lugar, se analizaron los niveles de transcritos en plántulas de 5 y 10 días, tanto crecidas en luz como etioladas. La acumulación de transcritos más alta en la mayoría de los casos analizados fue la correspondiente a los genes *AtBGAL1*, *AtBGAL3* y *AtBGAL4*, mientras que los transcritos *AtBGAL2*, *AtBGAL5* y *AtBGAL12*, presentaron los niveles más bajos, tanto en plántulas de 5 como de 10 días. A los 5 días, los transcritos de los genes *AtBGAL1*, *AtBGAL2* y *AtBGAL3* presentaron niveles mayores en las plántulas crecidas en luz que en las etioladas, siendo siempre más abundantes en la parte aérea que en la raíz. En el caso del *AtBGAL4* se dio el patrón inverso, con mas acumulación de transcritos en plántulas etioladas de 5 días que en las crecidas en luz. En plántulas etioladas de 10 días los niveles de transcrito de todos los genes *AtBGAL* disminuyeron de forma notable respecto a las plántulas etioladas de 5 días, a excepción de los *AtBGAL1*. Además, en todos los casos fueron menores a los encontrados en plántulas de 10 días crecidas en luz, excepto en *AtBGAL1* y *AtBGAL4*. En plántulas de 10 días crecidas en luz los transcritos *AtBGAL1*, *AtBGAL2* y *AtBGAL3* en la parte aérea fueron notablemente menores que a los 5 días, tendencia que también se pudo observar en las raíces.

Los niveles de transcritos de los seis genes de β -galactosidasas de la subfamilia a1 de *A. thaliana* en planta se analizaron a lo largo del desarrollo en diferentes órganos. Así, se utilizó el 1^{er}, 2^o y 3^{er} par de hojas de roseta; la raíz de plantas de 17 días; el 1^{er} entrenudo 3^{er} entrenudo de plantas de entre 28 y 32 días, así como los botones florales, flores abiertas y silicuas jóvenes. En las hojas de roseta los transcritos *AtBGAL1* y *AtBGAL2* presentaron niveles ligeramente superiores en el 2^o par que en el 1^o y 3^o. *AtBGAL3* presentó niveles muy bajos en el 1^o par de hojas en comparación con el 2^o y el 3^o, mientras que ocurrió lo contrario en *AtBGAL4*. Los niveles más altos de transcrito en las raíces fueron los correspondientes al gen *AtBGAL1*, seguidos de los de *AtBGAL3* y *AtBGAL4*, mientras que los *AtBGAL5* y *12* fueron los menos representados en este órgano. Respecto a los entrenudos, los transcritos *AtBGAL4*, fueron muy bajos en el 3^o y muy elevados en el 1^o. Esta misma tendencia, se observó con los transcritos *AtBGAL2* y con los transcritos *AtBGAL5*. Los transcritos *AtBGAL3* y *AtBGAL1* presentaron valores similares en los dos entrenudos. En la etapa reproductora cabe destacar, además de los altos niveles de transcritos *AtBGAL12* en los botones florales en comparación con el resto de órganos estudiados, las diferencias observadas en los transcritos *AtBGAL4*, que se incrementan de manera notable en flores abiertas respecto al botón floral, para descender de forma acusada en las silicuas jóvenes.

2. Caracterización de mutantes *knockout* de β -galactosidasas de la subfamilia a1 de *A. thaliana*

Como una segunda aproximación al estudio de la subfamilia a1 de β -galactosidasas de arabis, nos propusimos utilizar mutantes *knockout* de los genes *AtBGAL2*, *AtBGAL4* y *AtBGAL12* (*bgal2*, *bgal4* y *bgal12* respectivamente), seleccionados en base a la actividad de los promotores correspondientes (Albornos y col., 2012), con el objetivo de que su caracterización fenotípica nos ayudase, tanto a determinar la función fisiológica de sus enzimas. Las semillas de los mutantes *bgal2*, *bgal4* y *bgal12* (mutantes de inserción de T-DNA) se obtuvieron de la colección SALK (stock SALK_022121, SALK_022796 y SALK_087787, respectivamente). Se determinaron las líneas homocigóticas con las que se llevaron a cabo los distintos análisis, se analizó por RT-PCR a partir de cDNA de plántulas de 10 días la ausencia de transcritos de cada uno de los genes *AtBGAL* en los mutantes correspondientes. No

se observó amplificación en el cDNA de las líneas seleccionadas como homocigóticas, pero sí en los correspondientes tipos silvestres, lo que valida el proceso de selección.

Tras realizar un estudio morfológico de cada uno de los mutantes, no fue posible detectar cambios respecto a sus correspondientes WT en ninguno de los órganos ni estados de desarrollo analizados, que cubrían todas las fases del desarrollo tanto vegetativo como reproductor. Aún así, decidimos realizar una caracterización más detallada de las paredes celulares de cada uno de ellos, analizando tanto las proteínas, como la capacidad autohidrolítica y las posibles modificaciones del componente polisacárido.

Una vez obtenidas las paredes celulares de plántulas de 10 días crecidas en condiciones de día largo de cada uno de los distintos mutantes (*bgal2*, *bgal4* y *bgal12*) y sus respectivos tipos silvestres, se procedió en primer lugar al análisis de las proteínas extraídas de las mismas. Se valoró también la actividad β -galactosidásica frente al sustrato p-nitrofenil-galactósido en estos extractos proteicos. Sorprendentemente, los extractos proteicos de los mutantes *bgal2* y *bgal4* presentaron una mayor actividad β -D-galactosidásica que los correspondientes WT. Por su parte, el mutante *bgal12* presentó una actividad similar a la obtenida en *WT/bgal12*.

Los mutantes *knockout* de los genes *AtBGAL* se utilizaron para comprobar si alguna de las β -galactosidasas objeto de estudio era la responsable del proceso autolítico en arabis. Para ello se valoró la capacidad autohidrolítica de paredes celulares de plantas de 10 días crecidas en luz de cada uno de los mutantes y de sus WT. La liberación de azúcar por las paredes celulares de los mutantes *bgal2* y *bgal12* fue mayor que en los WT (y muy superior a los controles), aunque únicamente se pudo considerar significativa la diferencia entre *bgal2*. Por otra parte, los valores obtenidos en el mutante *bgal4* fueron muy similares a los obtenidos en su tipo silvestre. Los azúcares reductores liberados presentan un patrón distinto al de los azúcares totales. En este caso, las paredes de los mutantes *bgal4* liberaron una menor cantidad de azúcares reductores que las de *WT/bgal4*. Los azúcares liberados en la autólisis de paredes celulares de los tres mutantes *bgal* y sus respectivos tipos silvestres. En todos los casos, las proporciones de los distintos azúcares (analizados por cromatografía en fase gaseosa) son muy similares, tanto en los mutantes como en

los tipos silvestres. La galactosa fue el azúcar liberado en mayor proporción, seguido de la arabinosa y, en menor medida, la ramnosa y la glucosa.

Se procedió a continuación a la caracterización de las paredes celulares, comenzando por el análisis de la composición en azúcares neutros de la pared celular de plántulas de 10 días crecidas en condiciones de luz de los tres mutantes y sus tipos silvestres. El azúcar mayoritario fue la galactosa, seguido de arabinosa, glucosa y en menor medida y con porcentajes similares, xilosa y ramnosa. En todos los casos, los porcentajes de manosa fueron muy bajos o indetectables. Las diferencias más acusadas se observaron entre *bgal2* y su WT con menores proporciones de galactosa y de xilosa en el mutante. Sin embargo, la diferencia más acusada fue el incremento en el porcentaje de glucosa en *bgal2* respecto a su WT.

Procedimos a continuación con el análisis mediante FTIR de las paredes celulares obtenidas a partir de plántulas de 10 días crecidas en condiciones de día largo. Sin embargo, ni el perfil de los espectros de absorción obtenido a partir de estas paredes, ni el análisis de componentes principales (PC) de los datos obtenidos nos permitió establecer diferencias entre los mutantes *bgal* y los WT. Por este motivo, se decidió estudiar las paredes celulares de plántulas de 3 días, crecidas tanto en condiciones de día largo como en oscuridad, analizando el residuo insoluble en alcohol (AIR). En base a los resultados obtenidos en el análisis *cluster* de los espectros, realizamos un análisis de componentes principales (PC) para identificar, de entre todas las variables analizadas (la absorción en el IR de los componentes de las paredes celulares), aquellas en que se basan las diferencias entre los grupos del dendrograma. Se analizaron todas las plantas en función de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), y se observó que en los tres grupos de plantas analizadas prácticamente toda la varianza (más de un 95%) se incluye en el PC1. Al analizar la distribución obtenida, vemos que el PC1, que agrupa prácticamente toda la varianza existente entre los distintos tipos de plántulas en cada uno de los casos, no permite separar los mutantes de sus WT. Así, mediante este análisis, no se puede establecer diferencias en los polímeros de la pared celular relacionadas con la mutación de los genes *AtBGAL*, al menos en estas condiciones y estados de desarrollo.

La caracterización morfológica y las pruebas bioquímicas realizadas hasta el momento no permitieron establecer diferencias entre los mutantes *bgal* y los

correspondientes WT. Finalmente, se decidió realizar cortes histológicos de distintos órganos para comprobar posibles cambios anatómicos a nivel tisular y en la distribución del galactano, posible sustrato de las β -galactosidasas objeto de este trabajo. El estudio se llevó a cabo sobre cortes transversales del primer y tercer entrenudo de plantas de entre 28 y 32 días (seleccionados, como se ha dicho anteriormente por su distinta capacidad de crecimiento) y cortes transversales del 2º par de hojas de roseta de plantas de 17 días (aún en expansión).

Los resultados obtenidos no nos permiten establecer diferencias entre los mutantes *bgal* y los WT, ni a nivel anatómico, ni en la distribución de galactano. Sí se observó en estas plantas la misma especificidad de marcaje en función de los diferentes tipos celulares descrita anteriormente para este anticuerpo en el capítulo I de esta memoria, así como la gradación en la intensidad de la señal en función del estado de desarrollo, aunque los niveles de galactano tanto en los entrenudos como en las hojas no presentaron variaciones significativas.

Discusión

En *Arabidopsis thaliana* la familia multigénica que codifica las β -galactosidasas de la familia GH35 está formada por 17 genes (Ahn y col., 2007), denominados *AtBGAL1* a *AtBGAL17*. En el presente trabajo, y con el objetivo de establecer la función de los miembros de la subfamilia a1 (que incluye *AtBGAL1*, *AtBGAL2*, *AtBGAL3*, *AtBGAL4*, *AtBGAL5* y *AtBGAL12*), nos hemos propuesto estudiar la acumulación de los transcritos de los seis miembros de la subfamilia a lo largo del desarrollo, así como estudiar los cambios fenotípicos en mutantes nulos de inserción de T-DNA para los correspondientes loci de tres miembros de esta subfamilia, en concreto del *AtBGAL2*, *AtBGAL4* y *AtBGAL12*, correspondientes a las proteínas que presentan más similitud con las β -galactosidasas β III-Gal y β IV-Gal de garbanzo.

Se ha propuesto que las proteínas BGAL de la subfamilia a1 están localizadas en la pared celular (Lee y col., 2007; Gantulga y col., 2009) y se han descrito como exogalactanasas capaces de actuar sobre los polisacáridos pécticos de la misma, desempeñando funciones importantes en la remodelación de esta estructura durante el crecimiento y desarrollo vegetal (Gantulga y col., 2009), aunque todavía no se ha demostrado cuáles son esas funciones. Recientemente, en nuestro grupo de investigación, hemos determinado la actividad de los promotores de los genes *AtBGAL*

de esta subfamilia, que apuntan a una posible función de las proteínas correspondientes en procesos como la expansión celular (BGAL1, BGAL3 y BGAL4), la elongación de hipocotilos (BGAL2), el desarrollo de los tricomas (BGAL5) y en las etapas iniciales de la diferenciación (BGAL12) (Albornos y col., 2012). Los estudios realizados sobre la acumulación de transcritos de los genes que codifican β -galactosidasas mediante RT-PCR y análisis de microarrays (Iglesias y col., 2006; Ahn y col., 2007; Gantulga y col., 2008; 2009) presentan, en ocasiones, datos contradictorios. Esto, unido al hecho de que la actividad de los promotores no tiene por qué coincidir en todos los casos con el perfil de expresión de los genes debido a mecanismos de regulación adicionales, hace necesario realizar un estudio más detallado sobre el patrón de expresión de los miembros de la subfamilia a1 de β -galactosidasas.

Los transcritos de los diferentes genes *AtBGAL* de la subfamilia a1 se detectaron, en mayor o menor medida, en las plántulas de 5 y 10 días, tanto etioladas como crecidas en luz, lo que confirma la presencia de todos ellos en momentos iniciales del desarrollo. Estos resultados permiten resolver las discrepancias encontradas en la bibliografía referentes a la expresión o la no expresión de los genes *AtBGAL2* y *AtBGAL4* en plántulas (Ahn y col., 2007; Gantulga y col., 2009), discrepancias que podrían deberse al uso de distintas condiciones de crecimiento o a diferencias en la edad del material vegetal utilizado. La presencia de estos transcritos en plántulas confirman además estudios previos de la actividad de los promotores de los genes de la subfamilia (Albornos y col., 2012).

En plántulas etioladas, destacan los altos niveles de transcritos *AtBGAL4*, que se acumularon con mayores niveles a los 5 que a los 10 días si bien esta misma tendencia relacionada con la edad de las plantas, aunque con menores niveles de transcrito, también se observó en el resto de genes *AtBGAL*, excepto en *AtBGAL1*.

Esta mayor acumulación de los transcritos *AtBGAL4* en las plántulas etioladas más jóvenes podría hacernos pensar en una relación directa de la β -galactosidasa correspondiente con la elongación de los hipocotilos, debido a su mayor tasa de crecimiento en condiciones de oscuridad en este estadio. Sin embargo, debemos tener en cuenta que en este trabajo se ha analizado de forma conjunta el hipocotilo y la radícula de las plántulas etioladas, por lo que la diferencia en los niveles de transcrito podrían estar condicionadas por su presencia en ambos órganos. De hecho, únicamente la

actividad de los promotores *AtBGAL2* y *AtBGAL12*, apuntaba a una relación clara con la elongación de los hipocotilos (Marcus, 2011; Albornos y col., 2012). Además, si tenemos en cuenta la baja actividad de los promotores de estos dos genes en raíces de plantas etioladas (Albornos y col., 2012) y los bajos niveles de transcritos *AtBGAL2* y *AtBGAL12* encontrados en estos órganos, tanto en plántulas como plantas adultas sí podemos considerar la implicación de estas β -galactosidasas en la elongación del hipocotilo, a pesar de sus bajos niveles de transcrito, sin descartar la acción coordinada con el resto de miembros de la familia.

Los transcritos *AtBGAL1*, *AtBGAL2* y *AtBGAL3* presentan niveles muy elevados en la parte aérea (hipocotilo, cotiledones y primeras hojas en desarrollo) de plántulas de 5 días crecidas en luz, en comparación con la raíz, las plántulas etioladas de la misma edad, o incluso con la parte aérea de plantas de más edad. Considerando la alta actividad de los promotores *pAtBGAL1*, *pAtBGAL2* y *pAtBGAL3* en los cotiledones y en los primordios foliares desde el principio del desarrollo, que va disminuyendo a medida que estos órganos maduran, y la muy baja actividad de estos promotores en el hipocotilo de plántulas de 5 días (Albornos y col., 2012), parece probable que los niveles de transcritos detectados se correspondan de forma mayoritaria con los cotiledones y los primordios foliares. Así, los altos niveles de transcritos de estos tres genes podría apuntar a una participación de las enzimas por ellos codificadas en las modificaciones de la pared celular durante los primeros momentos de la expansión de los cotiledones y primordios foliares.

En *arabidopsis*, como en otras plantas superiores, los cotiledones se desarrollan durante la embriogénesis y su crecimiento después de la germinación está determinado por la expansión de sus células y no por la división de las mismas (Tsukaya, 2002), lo que podría indicar la implicación de las β -galactosidasas *BGAL1*, *BGAL2* y *BGAL3* en la expansión de los mismos. Se ha descrito que durante la expansión de los cotiledones de algodón la pared celular presenta elevados niveles de actividad endopoligalacturonásica acompañada de despolimerización del homogalacturonano, reducción de la arabinosa (Zhang y col., 2007) y variaciones en una ramnogalacturonano liasa (Naran y col., 2007), que podrían indicar que se está produciendo la degradación del componente péctico de la pared celular, necesaria para la expansión celular (Zhang y col., 2007).

De acuerdo con la implicación de *AtBGAL1*, *AtBGAL2* y *AtBGAL3* en la expansión, la disminución de transcritos de estos tres genes en la parte aérea de plántulas de más edad a los 10 días, apunta a que estas β -galactosidasas estarían más directamente implicadas en la relajación de la pared celular durante el inicio de expansión de los órganos foliares. Igualmente, la menor acumulación de transcritos *AtBGAL1*, *AtBGAL2* y *AtBGAL3* en plántulas crecidas en oscuridad, en las que la expansión de los cotiledones es menor (Cosgrove, 1994; Quail y col., 1995), contribuye a reforzar esta hipótesis.

En las hojas de la roseta, la actividad de los promotores *AtBGAL1*, *AtBGAL2* y *AtBGAL3* sigue la misma tendencia que en los cotiledones, con niveles altos al comienzo de la expansión, que disminuyen al ralentizarse esta, hasta desaparecer completamente o quedar limitada a zonas muy concretas, como el peciolo o los nervios centrales, en hojas maduras (Albornos y col., 2012). Esta relación con la expansión de las hojas se confirma al analizar la acumulación de transcritos *AtBGAL3*, notablemente más altos en el segundo y tercer par de hojas de roseta, más pequeñas, que en el primer par, totalmente expandido, indicando así la relación de la proteína BGAL3 con la expansión de los órganos foliares tanto en cotiledones como en hojas. Esta relación no es tan evidente entre *AtBGAL1* y 2 y la expansión de las hojas de roseta en plantas adultas, ya que no hay diferencias en la acumulación de sus transcritos durante el desarrollo de las hojas. Esto podría indicar una función adicional de las proteínas BGAL1 y BGAL2 en el desarrollo de los órganos foliares, tal y como ya propusieron Albornos y col. (2012) en base a la actividad de los promotores de los genes que las codifican, que apuntaba a una implicación de las mismas en las etapas iniciales de la diferenciación de los tricomas y la diferenciación de los haces vasculares (Pérez, 2011; Albornos y col., 2012).

Las restantes *AtBGAL* de la subfamilia a1 no parecen estar relacionadas con el crecimiento de los órganos foliares. Los transcritos *AtBGAL5* y *AtBGAL12* están poco representados en estos órganos, siendo los menos representados de la subfamilia. No sorprende en el caso de *AtBGAL5*, cuyo promotor presenta una actividad muy marcada en los tricomas de las hojas en desarrollo de la roseta y prácticamente indetectable en otras partes de este órgano (Albornos y col., 2012). Los bajos niveles de transcritos concuerdan con esta especificidad en la actividad del promotor y ayuda a esclarecer las discrepancias encontradas en la bibliografía, en la que algunos autores señalan altos

niveles de transcritos del gen *AtBGAL5* en las rosetas (Ahn y col., 2007), mientras que otros detectaban bajos niveles de mRNA en estos órganos (Gantulga y col., 2009). Jacoby y col. (2008) ya identificaron a *AtBGAL5* como uno de los genes que se expresan en más altos niveles en los tricomas, junto con genes que codifican otras enzimas relacionadas con el metabolismo de la pared, como poligalacturonasas, pectinesterasas, o glicosiltransferasas. Así, la acumulación de sus transcritos, que decrece a medida que aumenta el estado de desarrollo de las hojas, podría indicar la participación de la proteína correspondiente en las modificaciones iniciales de las fracciones péctica y hemicelulósica de la pared celular, fundamentales para que el proceso de diferenciación de los tricomas se realice correctamente (Potikha y Delmer, 1995).

Los niveles de transcritos *AtBGAL4* fueron notablemente más elevados en el 1^{er} par de hojas de la roseta, más maduro, que en el 2^o y 3^o, lo que descarta su relación con la elongación de los órganos foliares y parece estar más implicado en procesos del final del desarrollo de los mismos. Aunque se había descrito una posible relación de la actividad del promotor *pAtBGAL4* con la expansión de los órganos foliares (Albornos y col., 2012), los estudios de expresión del gen *AtBGAL4* recogidos en la bibliografía mostraban datos contradictorios sobre la acumulación de transcritos en estos órganos, sin que se indicase en ningún caso su relación con la expansión de los mismos (Iglesias y col., 2006; Ahn y col., 2007; Gantulga y col., 2009).

Además de la participación en expansión de órganos foliares, la idea de que las β -galactosidasas puedan actuar en el crecimiento en elongación en tallos o raíces, mediante la modificación del componente péctico de la pared celular, ha sido propuesta por diferentes autores (Loescher y Nevins, 1972; Labavitch y Ray, 1974; Takeuchi y col., 1980; Masuda y col., 1985; Konno y Tsumuki, 1993). Estas enzimas parecen ser determinantes en los procesos de relajación de la pared celular que conducen al rápido crecimiento en longitud en diferentes materiales como los tallos y epicotilos (O'Donoghue y col., 1998; Martín y col., 2009) o el tubo polínico (Rogers y col., 2001; Hrubá y col., 2005).

Aunque la mayor acumulación de transcritos *AtBGAL4* en plántulas etioladas jóvenes, como se ha indicado, podría hacernos pensar en una relación directa con la elongación de hipocotilos, el análisis de los transcritos *AtBGAL4* en el resto de órganos

analizados, sobre todo en entrenudos, parecen indicar más bien una relación de la BGAL4 con los procesos finales de crecimiento, al igual que ocurre en relación a los órganos foliares. Así, en los entrenudos de plantas adultas los niveles de transcritos *AtBGAL4* fueron notablemente más abundantes en los más basales, con la elongación prácticamente finalizada, que en los apicales, en crecimiento activo, con niveles casi indetectables.

Como se ha señalado en el capítulo I de esta memoria, hemos podido comprobar que existe una gradación en los niveles de galactano, uno de los posibles sustratos de las β -galactosidasas de la subfamilia a1, desde los entrenudos apicales de tallos florales, con niveles altos y homogéneos en todos los tejidos, hasta las zonas más basales, con niveles notablemente inferiores, lo que nos permite relacionar la pérdida de este polímero péctico con el cese de la elongación de los entrenudos. La degradación de polisacáridos pécticos, y en concreto de las cadenas de galactano, a medida que se alcanzan estados de cese de crecimiento ha sido estudiada en otros sistemas vegetales como en hipocotilos de *Vigna radiata* y *Vigna angularis* (Nishitani y Masuda, 1981; Herve du Penhoat y col., 1987), epicotilos de guisante (Labavich y Ray, 1974) o tallos de alfalfa y garbanzo (Jung y Engels, 2002; Martín y col., 2013).

Esto podría indicar que las β -galactosidasas de arabisopsis cuyos genes se expresan de forma preferente en los entrenudos más basales, principalmente la BGAL4, estarían implicadas en las modificaciones de la pared celular en estados avanzados de desarrollo, disminuyendo la tasa de elongación. No es la primera vez que se relaciona a las β -galactosidasas con el cese de la elongación. En garbanzo, la acción de las proteínas β I-Gal y β IV-Gal favorecen la compactación de la pared celular en determinados tejidos tras el cese de la elongación, lo que al mismo tiempo estaría permitiendo la diferenciación de los distintos tipos celulares en los que se localizan, que los capacita para desarrollar su función, como la función de soporte del colénquima o de las fibras del floema, o la función de transporte en el floema y xilema primarios, en los que se localizan estas proteínas (Martín y col., 2008; 2011).

Los transcritos *AtBGAL2* y *12* presentaron la misma tendencia que los *AtBGAL4*, aunque con los niveles más bajos de todos los órganos vegetativos estudiados. Esto podría estar indicando una actuación coordinada de las proteínas BGAL2, 4 y 12 en tejidos y tipos celulares concretos en los entrenudos más basales, contribuyendo a las

modificaciones de la pared celular necesarias en los procesos de diferenciación específicos de elementos traqueales (Ohdaira y col., 2002; Aspeborg y col., 2005), los elementos conductores del floema o las fibras de sostén (Dolan y col., 1995; Schindler y col., 1995; Gao y Showalter, 1999; Ohdaira y col., 2002; Aspeborg y col., 2005; Martín y col., 2008; 2011). Únicamente los transcritos *AtBGAL1* presentaron mayores niveles en el 3^{er} que en el 1^{er} entrenudo, aunque con valores notablemente más bajos que en el resto de órganos analizados, lo que relaciona a la proteína correspondiente con el proceso de elongación de los mismos y podría estar indicando su implicación en las modificaciones de las pectinas que facilitan la actuación de los agentes primarios de pérdida de rigidez, como las expansinas u otras proteínas de la pared que causarían directamente la expansión de la pared celular (Cosgrove, 2000b).

Con respecto a la posible función de esta familia en raíces, no se ha podido establecer una tendencia clara que relacione el estado de desarrollo de la raíz o su capacidad de elongación con una expresión diferencial de los genes *AtBGAL*. Entre radículas de 5 y 10 días se encontraron variaciones mínimas, observándose únicamente una disminución acusada en los transcritos *AtBGAL2* a los 10 días, aunque los niveles en ambos casos fueron muy bajos en comparación con el resto de miembros de la subfamilia. Tanto en radículas como en raíces de plantas adultas, *AtBGAL1*, 3 y 4 presentaron los niveles más altos de transcritos. Si atendemos a los datos recogidos en la bibliografía, existen discrepancias en cuanto a la expresión de los genes *AtBGAL* en radículas y raíces. Algunos autores han descrito niveles altos de transcritos *AtBGAL2* o *AtBGAL12* en raíces en crecimiento activo (Ahn y col., 2007; Iglesias y col., 2006) aunque, en base a la actividad de los promotores, los más directamente relacionados con la elongación serían *AtBGAL5* y *AtBGAL12*, mientras que *AtBGAL1*, 3 y 4 se expresarían de forma mayoritaria en la zona de maduración y diferenciación de tejidos vasculares (Albornos y col. 2012).

La presencia de transcritos *AtBGAL* en diferentes estadios de desarrollo de las raíces refleja su implicación en las modificaciones de la pared celular necesarias para la diferenciación de los distintos tejidos de las mismas. En diferentes especies, como *Arabidopsis* (McCartney y col., 2003; Willats y col., 2001) o lino (Vicré y col., 1998), hay una distribución diferencial de las pectinas y arabinogalactano proteínas (AGPs) entre células epidérmicas de zonas con distinta capacidad de elongación en las raíces. McCartney y col. (2003) sugieren incluso que las AGPs, cuya parte glucídica también

es susceptible de la acción de las β -galactosidasas, podrían estar implicadas en el metabolismo de los galactanos en la epidermis, endodermis y córtex en la zona de máxima elongación, bien controlando su deposición o regulando el acceso de enzimas hidrolíticas que actúan específicamente sobre los galactanos.

Además, la implicación de las β -galactosidasas en el desarrollo de la raíz se ha descrito ampliamente en garbanzo, donde los diferentes miembros de la familia multigénica de β -galactosidasas están implicados en procesos como la elongación o la diferenciación de las raíces laterales (Martín y col., 2009), al igual que se ha propuesto para las proteínas BGAL5 y BGAL12 de arabisopsis (Albornos y col., 2012), o en la maduración y diferenciación de tejidos vasculares (Martín y col., 2008; 2011) al igual que lo propuesto para las BGAL1, 3 y 4 de arabisopsis (Albornos y col., 2012). En arabisopsis, además, no se puede descartar la actuación conjunta con otras β -galactosidasas, como la BGAL10, la única descrita hasta el momento con actividad frente al XG y cuyo promotor presenta una alta actividad en la zona de elongación de las raíces (Sampedro y col., 2012).

A lo largo del desarrollo de las flores se detectaron transcritos de todos los miembros de la subfamilia a1 en los dos estados analizados (botón floral y flor abierta), siendo los transcritos *AtBGAL1* y *3* los que presentaron niveles más altos, aunque no se puede establecer una relación clara con el grado de desarrollo de los mismos. Es destacable que los niveles de acumulación de transcritos *AtBGAL2* y *AtBGAL12* fueron más altos en los botones florales que en flores abiertas, lo que coincide con los análisis de actividad de los promotores y, en el caso de *AtBGAL2*, con los altos niveles de transcritos detectados por Gantulga y col. (2009) y nos permite relacionar a las proteínas BGAL2 y 12 con el desarrollo de las flores.

Durante el desarrollo de las flores se produce un fuerte metabolismo de los distintos componentes de la pared celular. Desde el comienzo del desarrollo de los botones florales hasta la apertura y maduración de las flores y la senescencia de las mismas, se produce una remodelación de las paredes celulares muy marcada en los órganos de todos los verticilos (Smyth y col., 1990; de Vetten y Huber, 1990; del Campillo y Lewis, 1992; Panavas y col., 1998; O'Donoghue, 2006; Singh y col., 2013), en los que podrían participar estas dos β -galactosidasas durante los primeros momentos de expansión de los órganos florales. De hecho, se ha descrito la acumulación de

transcritos de β -galactosidasas en las primeras etapas del desarrollo floral, en especies como *Brassica campestris* (Liu y col., 2013) o *Linum usitatissimum* (Hobson y Deyholos, 2013).

Por el contrario, los transcritos *AtBGAL4* presentan niveles más altos en flores abiertas que en el botón floral, lo que de nuevo indica la posible implicación de la proteína BGAL4 en etapas tardías del desarrollo, una vez que han finalizado los procesos de expansión celular, tal y como ocurre en órganos foliares o en entrenudos, sin descartar incluso que puedan intervenir en las primeras fases del proceso de senescencia. De hecho, en algunas especies se ha descrito un descenso en el contenido de galactosa de la pared celular acompañado de un aumento en la actividad β -galactosidásica asociada a la senescencia del perianto (de Vetten y Huber, 1990; O'Donoghue y col., 2002; Yap y col., 2008).

Por lo que respecta a las silicuas, los transcritos más representados son *AtBGAL1* y *AtBGAL3*. En el proceso de desarrollo del fruto de arabis, Louvet y col. (2011) han descrito un descenso en el contenido de galactosa y arabinosa que podría estar asociado a la reducción de las cadenas laterales del RG I, sustrato de muchas β -galactosidasas vegetales. Además, se ha documentado la importancia del metabolismo del xiloglucano en la formación de las silicuas. En el mutante *bgal10*, correspondiente a la que, como hemos dicho anteriormente, es la única galactosidasa de arabis que se ha demostrado capaz de degradar el xiloglucano, se han observado alteraciones en la morfología de las silicuas, en concreto una reducción en su longitud. Esto podría apuntar a una participación coordinada de las β -galactosidasas en el metabolismo de la pared celular durante las primeras etapas del desarrollo del fruto de arabis. Debemos tener en cuenta que en este trabajo no se han separado las semillas del resto del fruto, por lo que los datos podrían estar condicionados a la expresión de los diferentes genes *AtBGAL* en semillas en este estado de desarrollo, si bien cabe destacar que no se detectó actividad de los promotores *pAtBGAL1* y *pAtBGAL3* en las mismas, ni en silicuas maduras (Albornos y col., 2012).

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto el variado rango de expresión de los 6 genes de la subfamilia a1 de β -galactosidasas de *A. thaliana*, que abarca todos los estados de desarrollo de la planta y todos los órganos analizados. Si bien en muchos casos la expresión de estos genes se solapa, sí se pueden

detectar diferencias que indicarían la participación de cada una de las isoformas en momentos determinados del crecimiento o en la diferenciación de estructuras determinadas.

Para ahondar en el estudio de tres de las β -galactosidasas de esta subfamilia, en concreto BGAL2, BGAL4 y BGAL12, nos propusimos emplear mutantes nulos de inserción de T-DNA para los correspondientes loci, esperando que la caracterización fenotípica nos ayudase a determinar la función de estas enzimas en la fisiología de la planta. Una vez que se obtuvieron las líneas homocigóticas y se comprobó la ausencia de transcritos de cada uno de los genes mutados en cada caso, se realizó una completa caracterización fenotípica, tanto a nivel morfológico como de sus paredes celulares.

Se observaron algunas diferencias puntuales entre los mutantes y sus tipos silvestres, como una mayor actividad β -galactosidásica en extractos proteicos de paredes celulares de plántulas de 10 días en el mutante *bgal4* respecto a su tipo silvestre, o ligeras variaciones en las proporciones de glucosa, galactosa o xilosa en *bgal2* al analizar su composición en azúcares neutros no celulósicos. Sin embargo, estos ligeros cambios no se han traducido en cambios a nivel morfológico, ni se han podido establecer diferencias en las paredes celulares por métodos como la espectroscopía FTIR o por técnicas de inmunolocalización.

De igual forma, se intentó comprobar si la ausencia de alguna de estas β -galactosidasas inhibía o reducía el proceso de autólisis enzimática de las paredes celulares de arábidopsis. Únicamente se observó una ligera disminución de este proceso en las paredes celulares del mutante *bgal4* respecto a su tipo silvestre. Por lo tanto, en base a estos resultados, no podemos afirmar que alguna de las BGAL estudiadas sea la responsable, al menos de forma exclusiva, del proceso autolítico de la pared celular, a diferencia de lo que ocurre en garbanzo, en el que sólo una β -galactosidasa es responsable de la autólisis (Dopico y col., 1989; 1991).

La ausencia de cambios fenotípicos notables en estos mutantes nos hace pensar que alguna otra β -galactosidasas, ya sea de la subfamilia a1 o no, podría estar compensando la pérdida de función de las proteínas BGAL2, BGAL4 y BGAL12, lo que indicaría la redundancia funcional entre distintos miembros dentro de esta familia multigénica. El fenómeno de redundancia funcional no es infrecuente en el reino vegetal

y se ha descrito en numerosas ocasiones en distintas familias multigénicas que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo de la pared. Por ejemplo, dentro de la familia multigénica de las celulosa sintasas (CESA) de arábidopsis, en la que se han descrito diez miembros (Richmond, 2000), se ha observado este fenómeno de redundancia. De hecho, las ligeras alteraciones fenotípicas de mutantes *cesa6*, en los que se observa un crecimiento anisotrópico únicamente en las células de la raíz y en hipocotilos etiolados (Fagard y col., 2000), se ven potenciadas en dobles mutantes *cesa2cesa6* (Persson y col. 2007) y *cesa5cesa6* (Desprez y col., 2007), en los que los fenotipos de crecimiento son notablemente más severos, indicando así una compensación funcional entre distintos miembros de la familia. De igual forma, este fenómeno se ha observado en la familia multigénica de XTHs de arábidopsis, compuesta por 33 miembros (Yokohama y Nishitani, 2000; Nishitani, 2002; Osato y col., 2006), o más recientemente en arroz, dentro de la familia de XTHs, compuesta por 29 miembros (Yokohama y col., 2004). En este caso, Hara y col. (2014) han observado que el silenciamiento de *OsXTH19* mediante RNAi, no produce ningún fenotipo notable, lo que estos autores atribuyen a fenómenos de compensación funcional por otras XTH de la familia.

Así pues, no sorprende la ausencia de cambios fenotípicos en los mutantes *bgal2*, *bgal4* y *bgal12*, especialmente si tenemos en cuenta los perfiles de acumulación de transcritos de cada uno de sus miembros. Como se ha comentado a lo largo de esta discusión, si bien es verdad que algunos de los genes presentan una expresión característica, como una mayor expresión de *AtBGAL4* en las zonas en las que se está produciendo el cese de la elongación, o una menor expresión de *AtBGAL12* en los distintos órganos analizados a lo largo del desarrollo, lo que podría apuntar a funciones muy específicas de estas β -galactosidasas en la fisiología de la planta, si comparamos la acumulación de los transcritos de los distintos genes en cada una de las etapas de desarrollo o zonas de la planta, podemos ver que en muchas ocasiones su expresión se solapa, lo que podría implicar una compensación funcional entre los distintos miembros de la subfamilia a1 cuando por diferentes circunstancias una de ellos no se produce o deja de ser funcional, lo que ocurre en los mutantes.

Esto nos plantea la necesidad de generar mutantes múltiples para distintos locus de los genes *AtBGAL* de esta subfamilia, esperando así que las posibles diferencias fenotípicas observadas en los mismos nos ayuden a establecer la función concreta de las β -galactosidasas de la subfamilia a1 en la fisiología de la planta.

Conclusiones

1. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* 35S:: β III-Gal transformadas con la ORF del gen *CanBGal-3* de *Cicer arietinum*, presentan una disminución del crecimiento, lo que se refleja en el tamaño de las plántulas, la longitud del tallo floral o el diámetro de la roseta. La proteína β III-Gal de garbanzo actúa sobre las paredes celulares de *Arabidopsis*, modificando su composición y estructura. En concreto, provoca una reducción de galactosa que es compensada con un aumento en el contenido de homogalacturonano y xiloglucano, indicando un papel importante de las cadenas de galactano en la organización estructural de la pared celular.

2. Las plantas de *Arabidopsis* 35S:: β IV-Gal, transformadas con la ORF del gen *CanBGal-4* de *C. arietinum*, al contrario de lo que ocurre en las plantas 35S:: β III-Gal, no presentan ningún cambio fenotípico, ni en su morfología ni en sus paredes celulares, lo que podría estar condicionado por las características diferenciales de ambas enzimas.

3. Los transcritos de los 6 genes *AtBGAL* de la subfamilia a1, que codifican β -galactosidasas de la pared celular de *A. thaliana*, se detectan en mayor o menor medida a lo largo de todas las etapas de desarrollo y en todos los órganos analizados. Aunque en ocasiones sus patrones de acumulación se solapan, es posible detectar diferencias que apuntan a una regulación diferencial de cada uno de ellos.

4. Los transcritos *AtBGAL1*, *AtBGAL2* y *AtBGAL3* presentan un patrón de acumulación similar durante la expansión de los cotiledones y las hojas de roseta, lo que podría indicar la acción coordinada de las proteínas correspondientes en estos procesos, si bien nuestros resultados no nos permiten descartar funciones específicas para cada una de ellas. La acumulación de transcritos *AtBGAL4* aparece en la mayoría de los casos asociada a estados avanzados del desarrollo, lo que podría reflejar la acción de la proteína BGAL4 en las modificaciones de la pared celular implicadas en el aumento de rigidez y la pérdida de la capacidad de elongación. Finalmente, los transcritos *AtBGAL5* y *AtBGAL12* presenta un patrón de acumulación menos característico y sus variaciones no permiten relacionarlos de forma evidente con procesos concretos del desarrollo.

5. Los mutantes *bgal2*, *bgal4* y *bgal12* no presentan cambios fenotípicos, lo que indicaría que otra β -galactosidasa compensaría la pérdida de función de las proteínas BGAL2, BGAL4 y BGAL12, apuntando así a un fenómeno de redundancia funcional entre distintos miembros de esta familia multigénica.

6. Las paredes celulares de *A. thaliana* presentan capacidad autohidrolítica de naturaleza enzimática. En este proceso se libera galactosa y arabinosa, lo que indica que podría estar mediada por la acción de β -galactosidasas, si bien las proteínas BGAL2, BGAL4 y BGAL12 no parecen ser las responsables, al menos de forma exclusiva, de este proceso.

Bibliografía

Ahn, Y.O.; Zheng, M.; Bevan, D.R.; Esen, A.; Shiu, S.H.; Benson, J.; Peng, H.P.; Miller, J.T.; Cheng, C.L.; Poulton, J.E.; Shih, M.C. (2007). Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 35. *Phytochem* 68: 1510-1520.

Albersheim, P. (1975). Walls of growing plant cells. *Sci. Am.* 232: 80-95.

Albersheim, P. (1976). The primary cell wall. En "Plant biochemistry" (J. Bonner y J.E. Varner, eds.), pp. 225-274. Academic press, New York. USA.

Albersheim, P.; Nevins, D.J.; English, P.D. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5: 340-345.

Albersheim, P.; Darvill, A.G.; O'Neill, M.A.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. (1996). A hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. En "Pectins and Pectinases" (J. Visser y A.G.J. Voragen, eds), Vol. 14, pp. 47-55. Elsevier Science B.V., Amsterdam. Holanda.

Albornos, L.; Martín, I.; Pérez, P.; Marcos, R.; Dopico, B.; Labrador, L. (2012). Promoter activities of genes encoding β -galactosidasas from *Arabidopsis* al subfamily. *Plant Physiol.* 60: 223-232.

Ali, Z.M.; Ng, S.Y.; Othman, R.; Goh, L.Y.; Lazan, H. (1998). Isolation, characterization and significance of papaya β -galactanases to cell wall modification and fruit softening during ripening. *Physiol. Plant.* 104: 105-115.

Al-Kaisey, M.T.; Wilkie, C.B. (1992). The polysaccharides of agricultural lupin seeds. *Carbohydr. Res.* 227: 147-161.

Alonso-Simón, A.; García-Angulo, P.; Mérida, H.; Encina, A.; Álvarez, J. M.; Acebes, J. L. (2011). The use of FTIR spectroscopy to monitor modifications in plant cell wall architecture caused by cellulose biosynthesis inhibitors. *Plant Sig. Beh.* 6: 1104-1110.

Andème-Onzighi, C.; Lhuissier, F.; Vicre, M.; Yamada, H.; Driouich, A. (2000). A (1-3,6)- β -D-galactosyl epitope containing uronic acids associated with bioactive pectins occurs in discrete cell wall domains in hypocotyl and root tissues of flax seedlings. *Histochem. Cell Biol.* 113: 61-70.

Asamizu, T.; Nakayama, N.; Nishi, A. (1984). Pectic polysaccharides in carrot cells growing in suspension culture. *Planta* 160: 469-473.

Aspeborg, H.; Schrader, J.; Coutinho, P.M.; Stam, M.; Kallas, A.; Djerbi, S.; Nilsson, P.; Denman, S.; Amini, B.; Sterky, F. (2005). Carbohydrateactive enzymes involved in the secondary cell wall biogenesis in hybrid aspen. *Plant Physiol.* 137: 983-997.

Bacic, A.; Harris, P.J.; Stone, B.A. (1988). Structure and function of plant cell walls. En "The biochemistry of plants, a comprehensive treatise" (J. Preiss, ed.), vol. 3, pp. 473-500. Academic Press, New York. USA.

Barnavon, L.; Doco, T.; Terrier, N.; Ageorges, A.; Romieu, C.; Pellerin, P. (2000). Analysis of cell wall neutral sugar composition, β -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 289-300.

Baron-Epel, O.; Gharyal, P.K.; Schindler, M. (1988). Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 175: 389-395.

Bauer, W.D.; Talmadge, K.W.; Keegstra, K.; Albersheim, P. (1973). The structure of plant cell walls. II. The hemicelluloses of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 51: 174-184.

BELFIELD, E.J.; RUPERTI, B.; ROBERTS, J.A.; MCQUEEN-MASON, S. (2005). CHANGES IN EXPANSIN ACTIVITY AND GENE EXPRESSION DURING ETHYLENE-PROMOTED LEAFLET ABSCISSION IN *SAMBUCUS NIGRA*. *J. EXP. BOT.* 56: 817-823.

Bell, A.A. (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 21-28.

- Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid. Res.* 7: 1513.
- Biswas, T.K. (1987).** Characterization of β -galactosidases from the germinating seeds of *Vigna sinensis*. *Phytochem.* 26: 359-364.
- Bolwell, G.P. (1993).** Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. *Int. Rev.Cytol.* 146: 261-324.
- Bosch-Reig, F.; Marcote, M.J.; Minina, M.D. (1992).** Separation and identification of sugars and maltodextrines by thin layer chromatography: application to biological fluids and human milk. *Talanta* 39: 1493-1498.
- Bradford, M.N. (1976).** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brillouet, J.M.; Riochet, D. (1983).** Cell wall polysaccharides and lignin in cotyledons and hulls of seeds from various lupins (*Lupinus L.*) species. *J. Sci. Food Agric.* 34: 861-868.
- Brown, K.E. (1997).** Ethylene and abscission. *Physiol. Plant.* 100: 567-576.
- Brown, Jr R.M.; Saxena, I.M.; Kudlicka, K. (1996).** Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends Plant Sci.* 1: 149-155.
- Brummell DA, Harpster MH, Civello PM, Palys JM, Bennett AB, Dunsmuir P. (1999).** Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell* 11: 2203-2216.
- Brummell, D.A.; Dal Cin, V.; Lurie, S.; Crisosto, C.H.; Labavitch, J.M. (2004).** Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *J. Exp. Bot.* 55: 2041-2052.
- Bucheli, P.; Buchala, A.J.; Meier, H. (1987).** Autolysis *in vitro* of cotton (*Gossypium hirsutum*) fibre cell walls. *Physiol. Plant.* 70: 633-638.
- Buckeridge, M.S.; Reid, J.S. (1994).** Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo-(1,4)- β -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius L.* seeds. *Planta* 192: 502-511.
- Buckeridge, M.S.; Crombie, H.J.; Mendes, C.J.M.; Reid, J.S.; Gidley, M.J.; Vieira, C.C.J. (1997).** A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril L.* (Leguminosae) cotyledons. *Carbohydr. Res.* 303: 233-237.
- Buckeridge, M.S.; dos Santos H.P.; Tiné, M.A.S. (2000).** Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 141-156.
- Burns, J.K. (1990).** α - and β -Galactosidase activities in juice vesicles of stored Valencia oranges. *Phytochem.* 29: 2425-2429.
- Burns, J.K. (2002).** Using molecular biology tools to identify abscission materials for citrus. *Hort. Sci.* 37: 459-464.
- Bush, M.S.; McCann, M.C. (1999).** Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Physiol. Plant.* 107: 201-213.
- Cantarel, B.L.; Coutinho, P.M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. (2009).** The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database Issue): D233-D238.
- Carey, A.T.; Holt, K.; Picard, S.; Wilde, R.; Tucker, A.G.; Bird, C.R.; Schuch, W.; Seymour, G.B. (1995).** Tomato Exo-(1,4)- β -D-Galactanase. Isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit, and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol.* 108: 1099-1107.
- Carpita, N.C.; 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 J.* 3: 1-30.
- Carpita, N.; McCann, M. (2000).** The cell wall. En "Biochemistry and molecular biology of plants" (B.B. Buchanan ed.), pp. 52-108. American Society of Plant Physiologists, Rockville. USA.
- Cassab, G.L. (1998).** Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 281-309.
- Cavalier, D.M.; Lerouxel, O.; Neumetzler, L.; Yamauchi, K.; Reinecke, A.; Freshour, G. (2008).** Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell* 20: 1519-1537.
- Cerná, M.; Barros, A.S.; Nunes, A.; Rocha, S.M.; Delgadillo, I.; Copiková, J.; Coimbra, M.A. (2003).** Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. *Carbohydr. Polym.* 51: 383-389.
- Chambat, G.; Joseleau, J.P. (1980).** Isolation and characterization of a homogalacturonan in the primary walls of *Rosa* cells cultured *in vitro*. *Carbohydr. Res.* 85: 10-12.

- Chantarangsee, M.; Tanthanuch, W.; Fujimura, T.; Fry, S.C.; Cairns, J.K. (2007).** Molecular characterization of β -galactosidases from germinating rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci.* 173: 118-134.
- Chun, J.P.; Huber, D.J. (1998).** Polygalacturonase-mediated solubilisation and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. *Plant Physiol.* 117: 1293-1299.
- Clough, S.J.; Bent, A.F. (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Cosgrove DJ (1994).** Photomodulation of growth. En "Photomorphogenesis in Plants" (R.E. Kendrick, G.H.M. Kronenberg, eds.), pp 631-658. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Noruega.
- Cosgrove, D.J. (1999).** Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 391-417.
- Cosgrove, D.J. (2000a).** New genes and new biological roles for expansins. *Curr. Op. Plant Biol.* 3: 73-78.
- Cosgrove, D.J. (2000b).** Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 109-124.
- Cosgrove, D.J. (2005).** Growth of the cell wall. *Nature Reviews. Mol. Cell Biol.* 6: 850-861.
- Cosgrove, D.J.; Bedinger, J.; Durachko, D.M. (1997).** Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6559-6564.
- Creelman, R.A.; Mullet, J.E. (1997).** Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9: 1211-1223.
- Crombie, H.J.; Chengappa, S.; Hellyer, A.; Reid, J.S.G. (1998).** A xyloglucan oligosaccharide-active transglycosylating β -D-glucosidase from the cotyledons of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) seedlings-purification, properties and characterization of a cDNA clone. *Plant J.* 15: 27-38.
- Culpepper, C.W.; Moon, H.H. (1989).** Effect of temperature upon the rate of elongation of the stems of asparagus grown under field conditions. *Plant Physiol.* 14: 255-270.
- Cumming, C.M.; Rizkallah, H.D.; McKendrick, K.A.; Abdel-Massih, R.M.; Baydoun, E.; Brett, C.T. (2005).** Biosynthesis and cell-wall deposition of a pectin-xyloglucan complex in pea. *Planta* 222: 546-555.
- De Alcántara, P.H.N.; Dietrich, S.M.C.; Buckeridge, M.S. (1999).** Xyloglucan mobilization and purification of a (XLLG/XLXG) specific β -galactosidase from cotyledons of *Copaiifera langsdorffii*. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 653-663.
- De Alcántara, P.H.N.; Martim, L.; Silva, C.O.; Dietrich, S.M.C.; Buckeridge, M.S. (2006).** Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 619-627.
- Dean, G.H.; Zheng, H.; Tewari, J.; Young, D.S.; Hwang, Y.T.; Western, T.L.; Carpita, N.C.; McCann, M.C.; Mansfield, S.D.; Haughn, G.W. (2007).** The *Arabidopsis MUM2* gene encodes a β -galactosidase required for the production of seed coat mucilage with correct hydration properties. *Plant Cell* 19: 4007-4021.
- Deblaere, R.; Bytebier, B.; Degreve, H.; Deboeck, F.; Schell, J.; Vanmontagu, M.; Leemans, J. (1985).** Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 13: 4777-4788.
- Del Campillo, E.; Lewis, L.N. (1992).** Identification and Kinetics of Accumulation of Proteins Induced by Ethylene in Bean Abscission Zones. *Plant Physiol.* 98: 955-961.
- Delmer, D.P.; Amor, Y. (1995).** Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* 7: 987-1000.
- Derbyshire, P.; McCann, M.C.; Roberts, K. (2007).** Restricted cell elongation in arabidopsis hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol.* 7: 31.
- Desprez, T.; Juraniec, M.; Crowell, E.F.; Jouy, H.; Pochylova, Z.; Parcy, F.; Höfte, H.; Gonneau, M.; Vernhettes, S. (2007).** Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15572-15577.
- de Vetten, N. C.; Huber, D.J. (1990).** Cell wall changes during the expansion and senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus*) petals. *Physiol. Plant.* 78: 447-454.
- Dey, P.M.; del Campillo, E. (1984).** Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants. En "Advances in Enzymology" (A. Meister, ed.), vol. 56, pp. 141-249. John Wiley and Sons, New York. USA.
- Dick, A.J.; Opuku-Gyamfua, A.; DeMarco, A.C. (1990).** Glycosidases of apple fruit: A multifunctional β -galactosidase. *Physiol. Plant.* 80: 250-256.
- Dolan, L.; Linstead, P.; Roberts, K. (1995).** An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from other vascular initials in the *Arabidopsis* roots. *Protoplasma* 189: 149-155.

- Dopico, B.; Labrador, E.; Nicolás, G. (1986).** Characterization and localization of the cell wall autolysis substrate in *Pisum sativum* epicotyls. *Plant Sci.* 44: 155-161.
- Dopico, B.; Nicolás, G.; Labrador, E. (1989).** Partial purification of cell wall β -galactosidases from *Cicer arietinum* epicotyls. Relationship with cell wall autolytic processes. *Physiol. Plant.* 75: 458-464.
- Dopico, B.; Nicolás, G.; Labrador, E. (1990a).** Characterization of a cell wall β -galactosidase of *Cicer arietinum* epicotyls involved in cell wall autolysis. *Physiol. Plant.* 80: 629-635.
- Dopico, B.; Nicolás, G.; Labrador, E. (1990b).** Changes during epicotyl growth of an autolysis-related β -galactosidase from the cell wall of *Cicer arietinum*. *Plant Sci.* 72: 45-51.
- Dopico, B.; Nicolás, G.; Labrador, E. (1990c).** Cell wall localization of the natural substrate of a β -galactosidase, the main enzyme responsible for the autolytic process of *Cicer arietinum* epicotyl cell walls. *Physiol. Plant.* 80: 636-641.
- Dopico, B.; Muñoz, F.J.; Nicolás, G.; Labrador, E. (1991).** Cell wall structure regulates the autolytic process throughout growth of *Cicer arietinum* epicotyls. *Physiol. Plant.* 83: 659-663.
- Dower, W.J.; Millar, J.F.; Ragsdale, C.W. (1988).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.
- Downs, C.G.; Almira, E.C. (1995).** A β -galactosidase (Genbank X84684) cDNA homolog from broccoli (*Brassica oleracea* L.). PGR 95-017. *Plant Physiol.* 108: 1342.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Ebringerová, A.; Heinze, T. (2000).** Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* 21: 542-556.
- Ebringerová, A.; Hromadkova, Z.; Heinze, T. (2005).** Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.* 186: 1-67.
- Eda, M.; Ishimaru, M.; Tada, T.; Sakamoto, T.; Kotake, T.; Tsumuraya, Y.; Mort, A.J.; Gross, K.C. (2014).** Enzymatic activity and substrate specificity of the recombinant tomato β -galactosidase 1. *J. Plant Physiol.* 171: 1454-1460.
- Edwards, M.; Bowman, J.L.; Dea, I.C.M.; Reid, J.S.G. (1988).** A β -D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) cotyledons. *J. Biol. Chem.* 263: 4333-4337.
- Ermel, F.F.; Follet-Gueye, M.L.; Cibert, C.; Vian, B.; Morvan, C.; Catesson, A.M.; Goldberg, R. (2000).** Differential localization of arabinan and galactan side chains of rhamnogalacturonan I in cambial derivatives. *Planta* 210: 732-740.
- Esteban, R.; Dopico, B.; Muñoz, F.J.; Romo, S.; Martín, I.; Labrador, E. (2003).** Cloning of a *Cicer arietinum* β -galactosidase with pectin-degrading function. *Plant Cell Physiol.* 44: 718-725.
- Esteban, R.; Labrador, E.; Dopico, B. (2005).** A family of β -galactosidase cDNAs related to development of vegetative tissue in *Cicer arietinum*. *Plant Sci.* 168: 457-466.
- Fagard, M.; Desnos, T.; Desprez, T.; Goubet, F.; Refregier, G.; Mouille, G.; McCann, M.; Rayon, C.; Vernhettes, S.; Höfte, H. (2000).** PROCUSTE1 encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 2409-2424.
- Farkas, V.; Maclachlan, G. (1988).** Stimulation of pea 1,4- β -glucanase activity by oligosaccharides derived from xyloglucan. *Carbohydr. Res.* 184: 213-220.
- Fenwick, K.M.; Jarvis, M.C.; Apperley, D.C. (1997).** Estimation of polymer rigidity in cell walls of growing and nongrowing celery collenchyma by solid-state nuclear magnetic resonance *in vivo*. *Plant Physiol.* 115: 587-592.
- Figueiredo, S.A.; Lashermes, P.; Lima-Aragão, F.J. (2011).** Molecular characterization and functional analysis of the β -galactosidase gene during *Coffea arabica* (L.) fruit development. *J. Exp. Bot.* 62: 2691-2703.
- Finer, K.R.; Finer, J.J. (2000).** Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:406-410.
- Franková, L.; Fry, S.C. (2015).** A general method for assaying homo- and hetero-transglycanase activities that act on plant cell-wall polysaccharides. *J. Integrat. Plant. Biol.* 55: 411-428.
- Fry, S.C. (1985).** Primary cell walls metabolism. En "Oxford surveys of plant molecular and cell biology" (B.J. Mifflin, ed.), vol. 2, pp. 1-42. Oxford Univ. Press, Oxford. U.K.
- Fry, S.C. (1986).** *In vivo* formation of xyloglucan nonasaccharide: a possible biologically active cell wall fragment. *Planta* 169: 443-453.
- Fry, S.C. (1989).** The structure and functions of xyloglucan. *J. Exp. Bot.* 40: 1-11.

- Fry, S.C.; Smith, R.C.; Renwick, K.F.; Martin, D.J.; Hodge, S.K.; Matthews, K.J. (1992). Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 282: 821-828.
- Fry, S.C.; York, W.S.; Albersheim, P.; Darvill, A.; Hayashi, T.; Joseleau, J.-P.; Kato, Y.; Lorences, E.P.; Maclachlan, G.A.; McNeil, M.; Mort, A.J.; Reid, J.S.G.; Seitz, H.U.; Selvendran, R.R.; Voragen, A.G.J.; White, A.R. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant.* 89: 1-3.
- Fry, S.C. (1995). Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 497-520.
- Fujino, T.; Itoh, T. (1998). Changes in pectin structure during epidermal cell elongation in pea (*Pisum sativum*) and its implications for cell wall architecture. *Plant Cell Physiol.* 39: 1315-1323.
- Gantulga, D.; Turan, Y.; Bavan, D.R.; Esen, A. (2008). The *Arabidopsis At1g45130* and *At3g52840* genes encode β -galactosidases with activity toward cell wall polysaccharides. *Phytochem.* 69: 1661-1670.
- Gantulga, D.; Ahn, Y.O.; Zhou, C.; Battogtokh, D.; Bevan, D.R.; Winkel, B.S.J.; Esen, A. (2009). Comparative characterization of the *Arabidopsis* subfamily 1 β -galactosidases. *Phytochem.* 70: 1999-2009.
- Gao, M.; Showalter, A.M. (1999). Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *Plant J.* 19: 321-331.
- Gaspar, Y.M.; Johnson, K.L.; McKenna, J.A.; Bacic, A.; Schultz, C.J. (2001). The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards a function. *Plant Mol. Biol.* 38: 623-632.
- Gerardi, C.; Blando, F.; Santino, A. (2012). Purification and chemical characterisation of a cell wall-associated β -galactosidase from mature sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 61: 123-130.
- Giannakouros, T.; Karagiorgos, A.; Simos, G. (1991). Expression of β -galactosidase multiple forms during barley (*Hordeum vulgare*) seed germination. Separation and characterization of enzyme isoforms. *Physiol. Plant.* 82: 413-418.
- Gilkes, N.R.; Hall, M.A. (1977). The hormonal control of cell wall turnover in *Pisum Sativum* L. *New Phytol.* 78: 1-15.
- Goldberg, R.; Morvan, C.; Roland, J.C. (1986). Composition, properties and localization in young and mature cells of mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 27: 417-429.
- Goldberg, R.; Devillers, R.; Morvan, C.; Michon, V.; Hervé du Penhoat, C. (1989). Control of cell wall plasticity. *Plant Cell Wall Polymers. "Biogenesis and Biodegradation"* (N.G. Lewis y M.C. Paice, eds), pp 312-323. American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Gossrau, R. (1976). Localization of glycosidases with naphthyl substrates. *Histochem. J.* 8: 271-282.
- Gross, K.C.; Wallner, S.J. (1979). Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiol.* 63: 117-120.
- Gruppen, H.; Hoffman, R.A.; Kormelink, F.J.M.; Voragen, A.G.J.; Kamerling, J.P.; Vligenthart, J.F.G. (1992). Characterization by HNMR spectroscopy of enzymically derived oligosaccharides from alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. *Carbohydr. Res.* 233: 45-64.
- Gulzar, S.; Amin, S. (2012). Kinetic studies on β -galactosidase isolated from apricots (*Prunus armeniaca* kaisa). *Am. J. Plant Sci.* 3: 636-645.
- Gy, I.; Kreis, M.; Lecharny, A. (2000). The β -galactosidases are encoded by a multigene family in *A. thaliana*. GenBank Accessions: CAB64773-64750.
- Ha, M.A.; Apperley, D.C.; Jarvis, M.C. (1997). Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls. *Plant Physiol.* 115: 593-598.
- Ha, M.A.; Viëtor, R.J.; Jardine, G.D.; Apperley, D.C.; Jarvis, M.C. (2005). Conformation and mobility of the arabinan and galactan side-chains of pectin. *Phytochem.* 66: 1817-1824.
- Hahn, M.G.; Bucheli, P.; Cervone, F.; Doares, S.H.; O'Neil, R.A.; Carvill, A.; Albersheim, P. (1989). Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. En "Plant-microbe interactions. Molecular and genetic perspectives" (T. Kosuge y E.W. Nesdter, eds.), vol. 3, pp. 131-181. McGraw Hill, New York. USA.
- Hall, B.G. (1998). Determining the evolutionary potential of a gene. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1055-1061.
- Hansen, G.; Chilton, M.D. (2000). Lesson in gene transfer to plants by a gifted microbe. *Plant Biotechnol. Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 240: 21-57.
- Hara, Y.; Yokoyama, R.; Osakabe, K.; Toki, S.; Nishitani, K. (2014). Function of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. *Ann. Bot.* 114: 1309-1318.

- Harris, P.J.; Anderson, M.A.; Bacic, A.; Clarcke, A.E. (1984).** Cell-cell recognition in plants with special reference to the pollen-stigma interaction. *Oxford Surv. Plant. Mol. Cell Biol.* 1: 161-203.
- Hartley, J.L.; Temple, G.F.; Brasch, M.A. (2000).** DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 10: 1788-1795.
- Hayashi, T. (1989).** Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 139-168.
- Hayashi, T. (1991).** Biochemistry of xyloglucans in regulating cell elongation and expansion. En "The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form" (C.W. Lloyd, ed) pp: 131-141 Academic Press.
- He, Z.H.; Cheeseman, I.; He, D.; Kohorn, B.D. (1999).** A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, WAK1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 39: 1189-1196.
- Henrissat, B. (1998).** Glycosidase families. *Biochem. Soc. Trans.* 26: 153-156.
- Hernández-Nistal, J.; Labrador, E.; Martín, I.; Jiménez, T.; Dopico, B. (2006).** Transcriptional profiling of cell wall protein genes in chickpea embryonic axes during germination and growth. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 684-692.
- Hernández-Nistal, J.; Martín, I.; Dopico, B.; Labrador, E. (2014).** Coordinated action of β -galactosidases in the cell wall of embryonic axes during chickpea germination and seedling growth. *Plant Biol.* 16: 404-410.
- Hervé du Penhoat, C.; Michon, V.; Goldberg, R. (1987).** Development of arabinans and galactans during the maturation of hypocotyls cells of mung bean (*Vigna radiata* Wilzech). *Carbohydr. Res.* 166: 31-42.
- Hinz, S.W.A.; Verhoef, R.; Schols, H.A.; Vincken J.P.; Voragen A.G.J. (2005).** Type I arabinogalactan contains β -D-Galp-(1-3)- β -D-Galp structural elements. *Carbohydr. Res.* 340: 2135-2143.
- Hobson, N.; Deyholos, M.K. (2013).** Genomic and expression analysis of the flax (*Linum usitatissimum*) family of glycosyl hidrolase 35 genes. *BMC Genomics* 14: 344.
- Honoso, M.; Ishikawa, K.; Mineki, R.; Murayama, K.; Numata, C.; Ogawa, Y.; Takayanagi, Y.; Nitta, K. (1999).** Tandem repeat structure of rhamnose-binding lectin from catfish (*Silurus asotus*) eggs. *Biochim. Biophys. Acta* 1472: 668-675.
- Hoson, T.; Masuda, Y. (1995).** Concanavalin A inhibits auxin-induced elongation and breakdown of (1-3),(1-4)- β -D-glucans in segments of rice coleoptiles. *Plant Cell Physiol.* 120: 517-523.
- Hrubá, P.; Honys, D.; Twell, D.; Capkova, V.; Tupy, J. (2005).** Expression of β -galactosidase and β -xylosidase genes during microspore and pollen development. *Planta* 220: 931-940.
- Huisman, M.M.H.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. (1999).** Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal. *Carbohydr. Polym.* 38: 299-307.
- Iglesias, N.; Abelenda, J.A.; Rodiño, M.; Sampedro, J.; Revilla, G.; Zarra, I. (2006).** Apoplastic glycosidases active against xyloglucan oligosaccharides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 55-63.
- Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Iraki, N.M.; Singh, N.K.; Bressan, R.A.; Carpita, N.C. (1989).** Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress. *Plant Physiol.* 91: 48-53.
- Ishii, T. (1997).** O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls. *Plant Physiol.* 113: 1265-1272.
- Ishimaru, M.; Smith, D.L.; Gross, K.C. (2005).** Yeast expressed tomato β -galactosidase 1, 4, and 5 have activity against synthetic and plant-derived cell wall substrates. *Hort. Sci.* 40: 1092.
- Ishimaru, M.; Smith, D.L.; Mort, A.J.; Gross, K.C. (2009).** Enzymatic activity and substrate specificity of recombinant tomato β -galactosidases 4 and 5. *Planta* 229: 447-456.
- Itoh, T.; Ogawa, T. (1993).** Molecular architecture of the cell wall of polar cells in suspension culture, as revealed by rapid-freezing and deep-etching techniques. *Plant Cell Physiol.* 34: 1187-1196.
- Jakovy, M.J.; Falkenhan, D.; Mader, M.T.; Brininstool, G.; Wischnitzki, E.; Platz, N.; Hudson, A.; Hülkamp, M.; Larkin, J.; Schnittger, A. (2008).** Transcriptional profiling of mature *Arabidopsis* trichomes reveals that *NOECK* encodes the MIXTA-like transcriptional regulator MYB106. *Plant Physiol.* 148: 1583-1602.
- Jamet, E.; Canut, H.; Boudart, G.; Pont-Lezica, R.F. (2006).** Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends Plant Sci.* 11: 33-39.
- Jarvis, M.C. (1984).** Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell Env.* 7: 153-164.
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. (1987).** GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.

Jensen, U.B.; Yan, X.; Triel, C.; Woo, S.H.; Christensen, R.; Owens, D.M. (2008). A distinct population of clonogenic and multipotent murine follicular keratinocytes residing in the upper isthmus. *J. Cell Sci.* 121: 609–617.

Jiménez, T.; Martín, I.; Labrador, E.; Dopico, B. (2006). The immunolocation of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase specific to elongating tissues in *Cicer arietinum* suggests a role in the elongation of vascular cells. *J. Exp. Bot.* 57: 3979-3988.

Johnson, K.; Daniels, D.; Dowler, M.; Rayle, D.L. (1974). Activation of *Avena* coleoptile cell wall glycosidases by hydrogen ions and auxin. *Plant Physiol.* 53: 224-228.

JUNG, H.G.; ENGELS, F.M. (2002). ALFALFA STEM TISSUES. *CROP. SCI.*42: 524-534.

Kacuráková, M.; Capek, P.; Sasinková, V.; Wellner, N.; Ebringerová, A. (2000). FTIR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* 43: 195-203.

Kaneko, S.; Kobayashi, H. (2003). Purification and characterization of extracellular β -galactosidase secreted by suspension cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 67: 627-630.

Kang, I.K.; Suh, S.G.; Gross, K.C.; Byun, J.K. (1994). N-terminal amino acid sequence of persimmon fruit β -galactosidase. *Plant Physiol.* 105: 975-979.

Katsu, N.; Kamisaka, S. (1983). Quantitative and qualitative changes in cell wall polysaccharides in relation to growth and cell wall loosening in *Lactuca sativa* hypocotyls. *Physiol. Plant.* 58: 33-40.

Keegstra, K.; Albersheim, P. (1970). The involvement of glycosidases in the cell wall metabolism of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiol.* 45: 657-678.

Kende, H.; Bradford, K. J.; Brummell, D.A.; Cho, H.T.; Cosgrove, D.J.; Fleming, A.J.; Gehring, C.; Lee, Y.; McQueen-Mason, S.; Rose, J.K.C.; Voeselek, L.A.C.J. (2004). Nomenclature form members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol. Biol.* 55: 311-314.

Kieliszewski, M.J.; Shpak, E. (2001). Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1386-1398.

Kim, J.B.; Carpita, N.C. (1992). Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptyls. *Plant Physiol.* 98: 646-653.

King, G.A.; Woollard, D.C.; Irving, D.E.; Borst, W.M. (1990). Physiological changes in asparagus spear tips after harvest. *Physiol. Plant.* 80: 393-400.

King, G.A.; Davies, K.M. (1992). Identification, cDNA cloning, and analysis of mRNA having altered expression in tips of harvested asparagus spears. *Plant Physiol.* 100: 1661-1669.

King, G.A.; Davies, K.M. (1995). Cloning of a harvest-induced β -galactosidase from tips of harvested asparagus spears. *Plant Physiol.* 108: 419-420.

Knee, M. (1978). Properties of polygalacturonate and cell cohesion in apple fruit cortical tissue, *Phytochem.* 17: 1257-1260.

Konno, H.; Yamasaki, Y.; Katoh, K. (1986a). Purification and characterization of β -galactosidase from cell suspension cultures of *Marchantia polymorpha*. *Plant Sci.* 44: 97-104.

Konno, H.; Yamasaki, Y.; Katoh, K. (1986b). Characteristics of β -galactosidase purified from suspension cultures of carrot. *Physiol. Plant.* 68: 46-52.

Konno, H.; Yamasaki, Y.; Katoh, K. (1986c). Enzymatic degradation of pectic substances and cell walls purified from carrot cell cultures. *Phytochem.* 25: 623-627.

Konno, H.; Katoh, K.; Kubota, Y. (1988). Subunit structure and amino acid analyses of β -galactosidase purified from carrot cell cultures. *Phytochem.* 27: 1301-1302.

Konno, H.; Katoh, K. (1992). An extracellular β -galactosidase secreted from cell suspension cultures of carrot. Its purification and involvement in cell wall polysaccharide hydrolysis. *Physiol. Plant.* 85: 507-514.

Konno, H.; Tsumiki, H. (1993). **Purification of a β -galactosidase from rice shoots and its involvement in hydrolysis of the natural substrate in cell walls.** *Physiol. Plant.* 89: 40-47.

Kotake, T.; Dina, S.; Konishi, T.; Kaneko, S.; Igarashi K.; Samejima M.; Watanabe, Y.; Kimura K.; Tsumuraya, Y. (2005). Molecular cloning of a β -galactosidase from radish that specifically hydrolyzes β -(1-3)- and β -(1-6)-galactosyl residues of arabinogalactan protein. *Plant Physiol.* 138: 1563-1576.

Kulikova, A.K.; Gomarteli, M.M.; Tsereteli, A.K.; Vezborodov, A.M.; Kvesitadze, G.I.; Bilai, T.I. (1990). β -galactosidases of lower eukaryotes. *Appl. Biochem. Microbiol.* 25: 621-632.

Kundu, R.K.; De-Kundu, P.; Banerjee, A.C. (1990). Multiple forms of β -galactosidase from the germinating seeds of *Vigna radiata*. *Phytochem.* 29: 2079-2082.

- Kushner, S.R. (1978).** An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. En "Genetic Engineering" (H.W. Boyer y S. Nicosia, eds.), pp. 17-24. Elsevier, Amsterdam. Holanda.
- Labavitch, J.M.; Ray, P.M. (1974).** Turnover of cell wall polysaccharides in elongating pea stem segments. *Plant Physiol.* 53: 669-673.
- Labavitch, J.M.; Ray, P.M. (1978).** Structure of hemicellulosic polysaccharides of *Avena sativa* coleoptile cell walls. *Phytochem.* 17: 933-937.
- Labrador, E.; Nicolás, G. (1982).** Autolytic activities of the cell wall in rice coleoptiles. Effects of nojirimicin. *Physiol. Plant.* 64: 541-546.
- Labrador, E.; Nicolás, G. (1985).** Autolysis of cell walls in pea epicotyls during growth. Enzymatic activities involved. *Physiol. Plant.* 64: 541-546.
- Labrador, E.; Nevins D.J. (1989).** An exo- β -D-glucanase derived from *Zea* coleoptile walls with capacity to elicit cell elongation. *Physiol. Plant.* 77: 479-486.
- Lampport, D.T.A. (1965).** The protein component of the primary cell walls. *Adv. Bot. Res.* 2: 151-218.
- Lampport, D.T.A. (1970).** Cell wall metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21: 235-270.
- Lapasin, R.; Pricl, S. (1995).** The rheology of industrial polysaccharides. Theory and applications. Blackie, London. U.K. pp 279-281
- Lau, J.M.; McNeil, M.; Darvill, A.G.; Albersheim, P. (1985).** Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary walls of plants. *Carbohydr. Res.* 137: 111-125.
- Lazan, H.; Ng, S.Y.; Goh, L.Y.; Ali, Z.M. (2004).** Papaya β -galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 847-853.
- Le Goff, A.; Renard, C.M.G.C.; Bonnin, E.; Thibault, J.F. (2001).** Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydr. Polym.* 45: 325-334.
- Lee, E.J.; Matsumura, Y.; Soga, K.; Hoson, T.; Koizumi, N. (2007).** Glycosyl hydrolases of cell wall are induced by sugar starvation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 48: 405-413.
- Levy, S.; York, W.S.; Stuike-Prill, R.; Meyer, B.; Staehelin, L.A. (1991).** Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated side chain in surface-specific sidechain folding. *Plant J.* 1: 195-215.
- Levy, S.; Staehelin, L.A. (1992).** Synthesis, assembly and function of plant cell wall macromolecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 856-862.
- Liepmann, A.H.; Wightman, R.; Geshi, N.; Turner, S.R.; Scheller, H.V. (2010).** *Arabidopsis*-a powerful model system for plant cell wall. *Plant J.* 61: 1107-1121.
- Liu, J.; Gao, M.; Lv, M.; Cao, J. (2013).** Structure, evolution, and expression of the β -galactosidase gene family in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31: 1249-1260.
- Liwanag, A.J.; Ebert, B.; Verhertbruggen, Y.; Rennie, E.A.; Rautengarten, C.; Oikawa, A.; Andersen, M.C.; Clausen, M.H.; Scheller, H.V. (2012).** Pectin biosynthesis: GAL51 in *Arabidopsis thaliana* is a β -1,4-galactan β -1,4-galactosyltransferase. *Plant Cell* 24: 5024-5036.
- Lo, J.T.; Mukerji, K.; Awasthi, Y.C.; Hanada, E.; Suzuki, K.; Srivastava, S.K. (1979).** Purification and properties of sphingolipid β -galactosidase from human placenta. *J. Biol. Chem.* 254: 6710-6715.
- Loescher, W.; Nevins, D.J. (1972).** Auxin-induced changes in avena coleoptile cell wall composition. *Plant Physiol.* 50: 556-563.
- Loopstra, C.A.; Puryear, J.D.; No, E.G. (2000).** Purification and cloning of an arabinogalactan-protein from xylem of loblolly pine. *Planta* 210: 686-689.
- Louvet, R.; Rayon, C.; Domon, J.C.; Rusterucci, C.; Fournet, F.; Leauatic, A.; Crépeau, M.J.; Ralet, M.C.; Rihouey, C.; Bardor, M.; Lerouge, P.; Gillet, F.; Pelloux, J. (2011).** Major changes in the cell wall during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem.* 72: 59-67.
- Macquet, A.; Ralet, M.C.; Kronenberger, J.; Marion-Poll, A.; North, H.M. (2007).** In situ, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. *Plant Cell Physiol.* 48: 984-999.
- Marcus, S.E.; Verhertbruggen, Y.; Hervé, C.; Ordaz-Ortiz, J.J.; Farkas, V.; Pedersen, H.L.; Willats, W.G.T.; Knox, J.P. (2008).** Pectic homogalacturonan mask abundant set of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.* 8: 60.
- Marry, M.; McCann, M.C.; Kolpak, F.; White, A.R.; Stacey, R.J.; Roberts, K. (2000).** Extraction of pectic polysaccharides from sugar-beet cell walls. *J. Sci. Food. Agr.* 80: 17-28.
- Martín, I.; Dopico, B.; Muñoz, F.J.; Esteban, R.; Oomen, R.J.F.J.; Driouich, A.; Vincken, J.P.; Visser, R.; Labrador, E. (2005).** *In vivo* expression of a *Cicer arietinum* β -galactosidase in potato

tubers leads to a reduction of the galactan side-chains in cell wall pectin. *Plant Cell Physiol.* 46: 1613-1622.

Martín, I.; Jiménez, T.; Esteban, R.; Dopico, B.; Labrador, E. (2008). Immunolocalization of a cell wall β -galactosidase reveals its developmentally regulated expression in *Cicer arietinum* and its relationship to vascular tissue. *J. Plant Growth Regul.* 27: 181-191.

Martín, I.; Jiménez, T.; Hernández-Nistal, J.; Labrador, E.; Dopico, B. (2009). The location of the chickpea cell wall β V-galactosidase suggests involvement in the transition between cell proliferation and cell elongation. *J. Plant Growth Regul.* 28: 1-11.

Martín, I.; Jiménez, T.; Hernández-Nistal, J.; Dopico, B.; Labrador, E. (2011). The β I-galactosidase of *Cicer arietinum* is located in thickened cell walls such as those of collenchyma, sclerenchyma and vascular tissue. *Plant Biol.* 13: 777-783.

Martín, I.; Hernández-Nistal, J.; Albornos, L.; Labrador, E.; Dopico, B. (2013). β III-Gal is involved in galactan reduction durin phloem element differentiation in chickpea stems. *Plant Cell Physiol.* 54: 960-970.

Masuda, H.; Ozeki, Y.; Amino, S.; Komamine, A. (1985). Changes in the activities of various glycosidases during carrot cell elongation in a 2,4-D-free medium. *Plant Cell Physiol.* 26: 995-1001.

McCann, M.C.; Wells, B.; Roberts, K. (1990). Direct visualization of cross-links in the primary plant cell walls. *J. Cell Sci.* 96: 323-334.

McCann, M.C.; Roberts, K. (1991). Architecture of the primary cell wall. En "The cytoskeletal basis of plant growth and form" (C.W. Lloyd, ed.), pp. 109-129. Academic Press, London.

McCann, M.C.; Stacey, N.J.; Wilson, R.; Roberts, K. (1993). Orientation of macromolecules in the walls of elongating carrot cells. *J. Cell Sci.* 106: 1347-1356.

McCann, M.C.; Roberts, K. (1994). Changes in cell wall architecture during cell elongation. *J. Exp. Bot.* 45: 1683-1691.

McCartney, L.; Ormerod, A.P.; Gidley, M.J.; Knox, J.P. (2000). Temporal and spatial regulation of pectic (1-4)- β -D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *Plant J.* 22: 105-113.

McCartney, L.; Steele-King, C.G.; Jordan, E.; Knox, J.P. (2003). Cell wall pectic (1-4)- β -D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. *Plant J.* 33: 447-454.

McDougall, C.J.; Fry, S.C. (1990). Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: evidence for a role of cellulase in cell expansion. *Plant Physiol.* 93: 1042-1048.

McNeil, M.; Darvill, A.G.; Fry, S.C.; Albersheim, P. (1982). Structure and function of the primary cell walls. XII. Identification of seven differently linked glycosyl residues attached to O-4 of 2,4-linked L-rhamnosyl residues of rhamnogalacturonan I. *Plant Physiol.* 70: 1586-1591.

McNeil, M.; Darvill, A.G.; Fry, S.C.; Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 625-663.

McQueen-Mason, S.J.; Cosgrove, D.J. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6574-6578.

McQueen-Mason, S.J.; Cosgrove, D.J. (1995). Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* 107: 87-100.

Melton, L.D.; McNeil, M.; Darvill, A.G.; Albersheim, P.; Dell, A. (1986). Structural characterization of oligosaccharides isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* 146: 279-305.

Miller, J.G.; Fry, S.C. (1992). Production and harvesting of ionically wall-bound extensin from living cell-suspension cultures. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 31: 61-66.

Montero, E.; Alonso, J.; Canada, F.J.; Fernandez-Mayoralas, A.; Martín-Lomas, M. (1998). Regioselectivity of the enzymatic transgalactosidation of D- and L-xylose catalysed by β -galactosidases. *Carbohydr. Res.* 305: 383-391.

Moore, P.J.; Darvill, A.G.; Albersheim, P.; Staehelin, A.L. (1986). Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalacturonan I in the cell wall of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 82: 787-794.

Mori, T.; Fujita, S.; Okahata, Y. (1997). Transglycosylation in a two-phase aqueous-organic system with catalysis by a lipid-coated β -D-galactosidase. *Carbohydr. Res.* 298: 65-73.

Muñoz, F.J.; Labrador, E.; Dopico, B. (1993). Effect of osmotic stress on the growth of epicotyls of *Cicer arietinum* in relation to changes in the cell wall composition. *Physiol. Plant.* 87: 552-560.

Muñoz, F.J.; Dopico, B.; Labrador, E. (1997). Two growth-related organ-specific cDNAs from *Cicer arietinum* epicotyls. *Plant Mol. Biol.* 35: 433-442.

Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with

tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Murray, A.K.; Bandurski, R.S. (1975). Correlative studies of cell wall enzymes and growth. *Plant Physiol.* 56: 143-147.

Nakagawa, T.; Kurose, T.; Hino, T.; Tanaka, K.; Kawamukai, M.; Niwa, Y.; Toyooka, K.; Matsuoka, K.; Jinbo, T.; Kimura, T. (2007). Development of series of Gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 34-41.

Nakamura, A.; Furuta, H.; Maeda, H.; Takao, T.; Nagamatsu, Y. (2002). Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1155-1158.

Naran, R.; Pierce, M.L.; Mort, A.J. (2007). Detection and identification of rhamnogalacturonan lyase activity in intercellular spaces of expanding cotton cotyledons. *Plant J.* 50: 95-107.

Ng, J.K.T.; Schröder, R.; Brummell, D.A.; Sutherland, P.W.; Hallett, I.C.; Smith, B.G.; Melton, L.D.; Johnston, J.W. (2015). Lower cell wall pectin solubilisation and galactose loss during early fruit development in apple (*Malus x domestica*) cultivar 'Scifresh' are associated with slower softening rate. *J. Plant Physiol.* 176: 129-137.

Nishitani, K. (2002). Genome-based approach to study the mechanism by which cell-wall type is defined and constructed by means of collaborative actions of wall-related enzymes. *J. Plant Res.* 115: 303-307.

Nishitani, K.; Masuda, Y. (1981). Auxin-induced changes in the cell wall structure: Changes in the sugar compositions, intrinsic viscosity and molecular weight distributions of matrix polysaccharides of the epicotyl cell wall of *Vigna angularis*. *Physiol. Plant.* 52:482-494.

Obro, J.; Borkhardt, B.; Harholt, J.; Skjöt, M.; Willats, W.G.; Ulvskov, P. (2009). Simultaneous in vivo truncation of pectic side chains. *Transgenic Res.* 18: 961-969.

O'Donoghue, E.M.; Somerfield, S.D.; Sinclair, B.K.; Graeme, A.K. (1998). Characterization of the harvest-induced expression of β -galactosidase in *Asparagus officinalis*. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 721-729.

O'Donoghue, E. M.; Somerfield, S.D.; Heyes, J.A. (2002). Organization of cell walls in *Sandersonia aurantiaca* floral tissue, *J. Exp. Bot.* 53: 513-523.

O'Donoghue, E. M.; Eason J.R.; Somerfield S.D.; Ryan, D.A. (2005). Galactosidases in opening, senescing and water-stressed *Sandersonia aurantiaca* flowers. *Funct. Plant Biol.* 32: 911-922.

O'Donoghue, E.M. (2006). Flower petal cell walls: changes associated with opening and senescence. *New Zeal. J. Forest Sci.* 36:134-144.

O'Donoghue, E. M.; Somerfield, S.D.; Watson, L.M.; Brummell, D.A.; Hunter, D.A. (2009). Galactose metabolism in cell walls of opening and senescing petunia petals. *Planta* 229: 709-721.

Ogawa, H.; Fukumoto, H.; Yano, T.; Yanamoto, K.; Tochikura, T. (1990). Purification and characterization of β -galactosidase from kiwifruit. *J. Jap. Soc. Food Sci. Tech.* 37: 298-305.

Ohdaira, Y.; Kakegawa, K.; Amino, S.; Sugiyama, M.; Fukuda, H. (2002). Activity of cell-wall degradation associated with differentiation of isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* into tracheary elements. *Planta* 215: 177-184.

Ohmiya, Y.; Samjima, M.; Shiroishi, M. (2000). Evidence that the endo-1,4- β -glucanases act on cellulose in suspension-cultured polar cells. *Plant J.* 24: 147-158.

O'Neill, M.A.; York, W.S. (2003). The composition and structure of plant primary cell walls. En "The plant cell wall" (J.K.C. Rose, ed), pp. 1-54. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K.

O'Neill, M.A.; Ishii, T.; Albersheim, P.; Darvill, A.G. (2004). Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 109-139.

Osato, Y.; Yokoyama, R.; Nishitani, K. (2006). A principal role for AtXTH18 in *Arabidopsis thaliana* root growth: a functional analysis using RNAi plants. *J Plant Res-* 119: 153-162.

Othman, R.; Chong, H.L.; Choo, T.S.; Ali, Z.M. (2011). Three β -galactosidase cDNA clones related to fruit ripening in papaya (*Carica papaya*). *Acta Physiol. Plant.* 33: 2301-2310.

Ozeki, Y.; Matsui, T.; Suzuki, M.; Titiani, K. (1991). Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassipina*) eggs. *Biochem.* 30: 2391-2394.

Panavas, T.; Walker, E.L.; Rubinstein, B. (1998). Possible involvement of abscisic acid in senescence of daylily petals. *J. Exp. Bot.* 49: 1987-1997.

Patterson, S.E. (2001). Cutting loose: abscission and dehiscence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 494-500.

- Pauly, M.; Albersheim, P.; Darvill, A.; York, W.S. (1999).** Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant J.* 20: 629-639.
- Pauly, M.; Qin, Q.; Greene, H.; Albersheim, P.; Darvill, A.; York, W.S. (2001).** Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. *Planta* 212: 842-850.
- Peaucelle, A.; Louvet, R.; Johansen, J.N.; Höfte, H.; Laufs, P.; Pelloux, J.; Mouille, G. (2008).** Arabidopsis Phyllotaxis Is Controlled by the Methyl-Esterification Status of Cell-Wall Pectins. *Current Biol.* 18: 1943-1948.
- Pena, M.J.; Ryden, P.; Madson, M.; Smith, A.C.; Carpita, N.C. (2004).** The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in arabidopsis during growth. *Plant Physiol.* 134: 443-451.
- Pérez, P. (2011).** Actividad de los promotores de los genes *AtBGAL2* y *AtBGAL5* de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Grado. Universidad de Salamanca.
- Perez-Almeida, I.B. (2004).** Arabidopsis cell wall β -galactosidase gene family: Expression, catalytic activities, biological function in galactose dynamics. Botany and Plant Pathology, Ph.D. Purdue, West Lafayette.
- Perrone, P.; Hewage, C.M.; Thomson, A.R.; Bailey, K.; Sadler, I.H.; Fry, S.C. (2002).** Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. *Phytochem.* 60: 67-77.
- Persson, S.; Paredes, A.; Carroll, A.; Palsdottir, H.; Doblin, M.; Poindexter, P.; Khitrov, N.; Auer, M.; Somerville, C.R. (2007).** Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15566-15571.
- Potikha, T.; Delmer, D.P. (1995).** A mutant of *Arabidopsis thaliana* displaying altered patterns of cellulose deposition. *Plant J.* 7: 453-460.
- Pressey, R. (1983).** β -Galactosidases in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 71: 356-359.
- Preston, R.D. (1974).** Plant cell walls. En: *Dynamic Aspects of Plant Ultrastructure*, pp. 256-309, A.W. Robards, ed McGraw-Hill, Londres.
- Quail, P.H.; Boylan, M.T.; Parks, B.M.; Short, T.W.; Xu, Y.; Wagner, D. (1995).** Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. *Science* 268: 675-680.
- Qui, X.; Tai, C.Y.; Wasserman, B.P. (1995).** Plasma membrane intrinsic proteins of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 108: 387-392.
- Raghothama, K.G.; Lawton, K.A.; Goldsbrough, P.B.; Woodson, W.R. (1991).** Characterization of an ethylene-regulated flower senescence-related gene from carnation. *Plant Mol. Biol.* 17: 61-71.
- Redgwell, R.J.; Melton, L.D.; Brasch, D.J. (1992).** Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilisation of the pectic polymers. *Plant Physiol.* 98: 71-81.
- Redgwell, R.J.; Fischer, M.; Kendal, E.; MacRae, E.A. (1997).** Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203: 174-181.
- Ricard, J.; Noat, G. (1986).** Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. I. A theory of the ionic control of a complex multi-enzyme system. *Eur. J. Biochem.* 155: 183-198.
- Richmond, T. (2000).** Higher plant cellulose synthases. *Genome Biol* 1: reviews 3001.1-3001.6.
- Ridley, B.L.; O'Neill, M.A.; Mohnen, D. (2001).** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochem.* 57: 929-967.
- Ringli, C.; Keller, B.; Ryser, U. (2001).** Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1430-1441.
- Röckel, N.; Wolf, S.; Kost, B.; Rausch, T.; Greiner, S. (2008).** Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PME1 at the pollen tube tip involves PME1 endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant J.* 53: 133-143.
- Rogers, H.J.; Maund, S.L.; Johnson, L.H. (2001).** A β -galactosidase-like gene is expressed during tobacco pollen development. *J. Exp. Bot.* 354: 67-75.
- Rose, J.K.C.; Lee, H.H.; Bennett, A.B. (1997).** Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5955-5960.
- Rose, J.K.C.; Bennett, A.B. (1999).** Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 4: 176-183.
- Ross, G.S.; Redgwell, R.J.; MacRae, E.A. (1993).** Kiwifruit β -galactosidase: isolation and activity against specific fruit cell-wall polysaccharides. *Planta* 189: 499-506.
- Ross, G.S.; Wegrzyn, T.; MacRae, E.A.; Redgwell, R.J. (1994).** Apple β -galactosidase. Activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol.* 106: 521-528.

- Rushing, J.W.; Huber, D.J. (1987).** Effects of NaCl, pH and Ca²⁺ on autolysis of isolated tomato fruit cell walls. *Physiol. Plant.* 70: 78-84.
- Ryden, P.; Sugimoto-Shirasu, K.; Smith, A.C.; Findlay, K.; Reiter, W.D.; McCann, M.C. (2003).** Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol.* 132: 1033-1040.
- Ryser, U.; Schorderet, M.; Zhao, G.F.; Studer, D.; Ruel, K.; Hauf, G.; Keller, B. (1997).** Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein. *Plant J.* 12: 97-111.
- Sachetto-Martins, G.; Franco, L.O.; Olivera, D.E. (2000).** Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif?. *Biochem. Biophys. Acta* 1492: 1-14.
- Sakurai, N.; Tanaka, S.; Kuraishi, S. (1987a).** Changes in wall polysaccharides of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls under water stress condition. I. Wall sugar composition and growth as affected by water stress. *Plant Cell Physiol.* 28: 1051-1058.
- Sakurai, N.; Tanaka, S.; Kuraishi, S. (1987b).** Changes in wall polysaccharides of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) hypocotyls under water stress condition. II. Composition of pectic and hemicellulosic polysaccharides. *Plant Cell Physiol.* 28: 1059-1070.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York.
- Sampedro, J.; Gianzo, C.; Iglesias, N.; Guitián, E.; Revilla, G.; Zarra, I. (2012).** AtBGAL10 is the main xyloglucan β -galactosidase in Arabidopsis, and its absence results in unusual xyloglucan subunits and growth defects. *Plant Physiol.* 158: 1146-1157.
- Satiat-Jeuemaitre, B.; Darzens, D. (1986).** *In vivo* hemicelluloses-cellulose equilibrium modifications: effects on helicoidal cell wall assembly. En "Cell Wall's 86", pp. 68-69. Paris.
- Scheggia, C.; Prisco, A.E.; Dey, P.M.; Daleo, G.R.; Pont Lezica, R. (1988).** Alteration of lectin pattern in potato tuber by virus X. *Plant Sci.* 58: 9-14.
- Scheller, H.V.; Jensen, J.K.; Sorensen, S.O.; Harholt, J.; Geshi, N. (2007).** Biosynthesis of pectin. *Physiol. Plant.* 129: 283-295.
- Schindler, T.; Bergfeld, R.; Schopfer, P. (1995).** Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *Plant J.* 7: 25-36.
- Schols, H.A.; Bakx, E.J.; Schipper D.; Voragen, A.G.J. (1995).** A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydr. Res.* 279: 265-279.
- Seara, J.; Nicolás, G.; Labrador, E. (1988).** Autolysis of the cell wall. Its possible role in endogenous and IAA-induced growth in epicotyls of *Cicer arietinum*. *Physiol. Plant.* 72: 769-774.
- Seifert, G.J.; Roberts, K. (2007).** The biology of arabinogalactan proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 137-161.
- Sekimata, M.; Ogura, K.; Tsemuraya, Y.; Hashimoto, Y.; Yamamoto, S. (1989).** A β -galactosidase from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Plant Physiol.* 90: 567-584.
- Serpe, M.D.; Nothnagel, E.A. (1999).** Arabinogalactan proteins in the multiple domains of the plant surface. *Adv. Bot. Res.* 30: 207-289.
- Showalter, A.M. (1993).** Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9-23.
- Simos, G.; Giannakouros, T.; Georgatos, J.G. (1989).** Plant β -galactosidases: purification by affinity chromatography and properties. *Phytochem.* 28: 2587-2592.
- Singh, M.B.; Knox, R.B. (1985).** β -Galactosidase of *Lilium* pollen. *Phytochem.* 24: 1639-1643.
- Singh, V.K.; Garg, R.; Jain, M. (2013).** A global view of transcriptome dynamics during flower development in chickpea by deep sequencing. *Plant Biotechnol. J.* 11: 691-701.
- Smith, L.D.; Starrett, D.A.; Gross, K.C. (1998).** A gene coding for tomato fruit β -galactosidase II is expressed during fruit ripening. *Plant Physiol.* 117: 417-423.
- Smith, L.D.; Gross, K.C. (2000).** A family of at least seven β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiol.* 123: 1173-1183.
- Smith, L.D.; Abbott, J.L.; Gross K.C. (2002).** Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiol.* 129: 1755-1762.
- Smyth, D. R.; Bowman, J. L.; Meyerowitz, E. M. (1990).** Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 2: 755-767.
- Somerville, C., Bauer, S.; Brininstool, G. (2004).** Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Sci.* 305: 2206-2211.
- Somogyi, M. (1952).** Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Sorensen, S.O.; Pauly, M.; Bush, M.; Skjot, M.; McCann, M.C.; Borkhardt, B.; Ulvskov, P. (2000).** Pectin engineering: modification of potato pectin by *in vivo* expression of an endo-1, 4- β -D-galactanase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7639-7644.

- SOUTHERN, E.M. (1975).** DETECTION OF SPECIFIC SEQUENCES AMONG DNA FRAGMENTS SEPARATED BY GEL ELECTROPHORESIS. *J. MOL. BIOL.* 98: 503-517.
- Stephen, A.M. (1982).** Other plant polysaccharides. En "The polysaccharides". Vol. 2 (G.O. Aspinall, ed), Vol. 2, pp. 97-193. Academic Press, New York, USA.
- Stevenson, T.T.; Darvill, A.G.; Albersheim, P. (1988).** Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* 182: 207-226.
- Strasser, G.R.; Amadó, R. (2001).** Pectic substances from red bet (*Beta vulgaris* conditiva). Part I. Structural analysis of rhamnogalacturonan I using enzymic degradation and methylation analysis. *Carbohydr. Polym.* 44: 63-70.
- Takeuchi, M.; Matshushima, H.; Yugawara, Y. (1980).** Long-term freeze-preservation of protoplast of carrot and *Marchantia* Cryo. *Letter 1:* 519-524.
- Talbott, L.D.; Ray, P.M. (1992).** Changes in molecular size of previously deposited and newly synthesized pea cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol.* 98: 369-379.
- Tanimoto, E.; Igari, M. (1976).** Correlation between β -galactosidase and auxin-induced elongation growth in etiolated pea stems. *Plant Cell Physiol.* 17: 673-682.
- Tanimoto, E.; Pilet, P.E. (1978).** α - and β -glycosidases in maize roots. *Planta* 138: 119-122.
- Tanimoto, E. (1985).** Axial distribution of glycosidases in relation to cellular growth and ageing in *Pisum sativum* root. *J. Exp. Bot.* 169: 1267-1274.
- Tanthanuch, W., Chantarangsee, M.; Maneesan, J.; Ketudat-Cairns, J. (2008).** Genomic and expression analysis of glycosyl hydrolase family 35 genes from rice (*Oryza sativa* L.), *BMC Plant Biol.* 8: 84.
- Tateishi, A.; Inoue, H.; Shiba, H.; Yamaki, S. (2001).** Molecular cloning of a β -galactosidase from japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) and its gene expression with fruit ripening. *Plant Cell Physiol.* 42: 492-498.
- Taylor, I.E.P.; Wallace, J.C.; Mackay, A.L.; Volke, F. (1990).** Use of chemical fractionation and proton nuclear magnetic resonance to probe the physical structure of the primary plant cell wall. *Plant Physiol.* 94: 174-178.
- Thibault, J.F.; Renard, C.M.G.C.; Axelos, M.A.V.; Roger, P.; Crepeau, M.J. (1993).** Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acidic-hydrolysis. *Carbohydr. Res.* 238: 271-286.
- Thibault, J.F.; Ralet, M.C. (2001).** Pectins, their origin, structure and functions. En "Advanced Dietary Fibre Technology" (B.V. McCleary y L. Prosky, eds), pp. 369-378. Blackwell Science. Oxford. U.K.
- Thimm, J.C.; Burritt, D.J.; Ducker, W.A.; Melton, L.D. (2000).** Celery (*Apium graveolens* L.) parenchyma cell walls examined by atomic force microscopy: Effect of dehydration on cellulose microfibrils. *Planta* 212: 25-32.
- Thimm, J.C.; Burritt, D.J.; Sims, I.M.; Newman, R.H.; Ducker, W.A.; Melton, L.D. (2002).** Celery (*Apium graveolens* L.) parenchyma cell walls: Cell walls with minimal xyloglucan. *Physiol. Plant.* 116: 164-171.
- Thompson, J.E.; Fry, S.C. (1997).** Trimming and solubilization of xyloglucan after deposition in the walls of cultured rose cells. *J. Exp. Bot.* 48: 297-305.
- Thompson, J.E.; Smith, R.C.; Fry, S.C. (1997).** Xyloglucan undergoes interpolymeric transglycosylation during binding to the plant cell wall in vivo: evidence from $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ dual labeling and isopycnic centrifugation in caesium trifluoroacetate. *Biochem. J.* 327: 699-708.
- Thompson, J.E.; Fry, S.C. (2000).** Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211: 275-286.
- Thompson, J.E.; Fry, S.C. (2001).** Restructuring of wall-bound xyloglucan by transglycosylation in living plant cells. *Plant J.* 26: 23-24.
- Tiné, M.A.S.; Cortelazzo, A.L.; Buckeridge, M.S. (2000).** Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Plant Sci.* 154: 117-126.
- Toman, R.; Karacsonyi, S.; Kubackova, M. (1972).** Polysaccharides from the bark of white willow (*Salix alba* L.): structure of a galactan. *Carbohydr. Res.* 44: 285-290.
- Trainotti, L.; Spinello, R.; Piovan, A.; Spolaore, S.; Casadoro, G. (2001).** β -Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *J. Exp. Bot.* 52: 1635-1645.
- Triantafyllidou, D.; Georgatsos, J.G. (2001).** Barley β -galactosidase: structure, function, heterogeneity and gene origin. *J. Protein Chem.* 20: 551-562.
- Tsukaya, H. (2002).** Leaf index: heteroblasty, natural variation, and the genetic control of polar processes of leaf expansion. *Plant Cell Physiol.* 43: 372-378.
- Valero, P.; Labrador, E. (1993).** Inhibition of cell autolysis and auxin-induced elongation of *Cicer arietinum* epicotyls by β -galactosidase antibodies. *Physiol. Plant.* 89: 199-203.

- Valero, P.; Labrador, E. (1995).** Effect of auxin on cell wall glycanhydrolytic enzymes in epicotyls of *Cicer arietinum*. *Physiol. Plant.* 93: 764-770.
- Valero, P.; Labrador, E. (1996).** Effect of water stress on the LiCl extracted-cell wall proteins and glycanhydrolytic enzymes during growth of *Cicer arietinum* epicotyls. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 307-313.
- Vallet, C.; Lemaire, G.; Monties, B.; Chabbert, B. (1998).** Cell wall fractionation of alfalfa stem in relation to internode development: biochemistry aspect. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3458-3467.
- Van Hengel, A.J.; Roberts, K. (2002).** Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in arabidopsis. *Plant J.* 32: 105-13.
- Vannier, M.P.; Thoiron, B.; Morvan, C.; Demarty, M. (1992).** Localization of methyltransferase activities throughout the endomembrane system of flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyls. *Biochem. J.* 286: 863-868.
- Varner, J.E.; Lin, L.S. (1989).** Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231-239.
- Verbruggen, M.A.; Spronk, B.A.; Schols, H.A. (1998).** Structures of enzymically derived oligosaccharides from sorghum glucuronoarabinoxylan. *Carbohydr. Res.* 306: 265-274.
- Vicré, M.; Jauneau, A.; Knox, J.P.; Driouich, A. (1998).** Immunolocalization of $\beta(1-4)$ - and $\beta(1-6)$ -D-galactan epitopes in the cell wall and Golgi stacks of developing flax root tissues. *Protoplasma* 203: 26-34.
- Vidal, S.; Doco, T.; Williams, P.; Pellerin, P.; York, W.S.; O'Neill, M.A. (2000).** Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the back-bone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydr. Res.* 326: 277-294.
- Vincken, J.P.; York, W.S.; Beldman, G.; Voragen, A.G.J. (1997).** Two general branching patterns of xyloglucan: XXXG and XXGG. *Plant Physiol.* 114: 9-12.
- Vincken J.P.; Schols, H.A.; Oomen, R.J.F.J.; McCann, M.C.; Ulvskov, P.; Voragen, A.G.J.; Visser, R.G.F. (2003a).** If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132: 1781-1789.
- Vincken, J.P.; Schols, H.A.; Oomen, R.J.F.J.; Beldman, G.; Visser, R.G.F.; Voragen, A.G.J. (2003b).** Pectin-the hairy thing. En "Advances in Pectin and Pectinase Research" (A.G.J. Voragen, H. Schols y R. Visser, eds), pp. 47-59. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Holanda.
- Visser, R.G.F.; Voragen, A.G.J. (1996).** Pectin and pectinases, progress in biotechnology. Elsevier, Amsterdam.
- Voragen, A.G.J.; Beldman, G.; Schols, H.A. (2001).** Chemistry and enzymology of pectins. En: "Advanced Dietary Fibre Technology" pp: 379-397. (B.V. McCleary; L. Prosky, eds). Blackwell Science, Oxford. U.K..
- Voragen, A.G.J.; Schols, H.A.; Visser, R.G.F. (2003).** Advances in Pectin and Pectinase Research. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Wagner, T.A.; Kohorn, B.D. (2001).** Wall associated kinases, WAKs, are expressed throughout development and are required for cell expansion. *Plant Cell* 13: 303-318.
- Walkinshaw, M.D.; Arnott, S. (1981).** Conformations and interactions of pectins. II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. *J. Mol. Biol.* 153: 1075-1085.
- Wehr, J.B.; Menzies, N.W.; Pax, F.; Blamey, C. (2004).** Inhibition of cell-wall autolysis and pectin degradation by cations. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 485-492.
- Wende, G.; Fry, S.C. (1997).** *O*-Feruloylated, *O*-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. *Phytochem.* 44: 1011-1018.
- White, P.B.; Wang, T.; Park, Y.B.; Cosgrove, D.J.; Hong, M. (2014).** Water-polysaccharide interactions in the primary cell wall of *Arabidopsis thaliana* from Polarization Transfer Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 136: 10399-10409.
- Whitney, S.E.C.; Bringham, J.E.; Darke, A.H.; Reid, J.S.G.; Gidley, M.J. (1995).** *In vitro* assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. *Plant J.* 8: 491-504.
- Willats, W.G.T.; Marcus, S.E.; Knox, J.P. (1998).** Generation of a monoclonal antibody specific to (1-5)- α -L-arabinan. *Carbohydr. Res.* 308: 149-152.
- Willats, W.G.T.; McCartney, L.; Mackie, W.; Knox, J.P. (2001).** Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47: 9-27.
- Wilson, L.G.; Fry, J.C. (1986).** Extensin - a major cell wall glycoprotein. *Plant Cell Environ.* 9: 239-260.
- Woolley, L.C.; James, D.J.; Manning, K. (2001).** Purification and properties of an endo- β -1,4-glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, *cel-1*. *Planta* 214: 11-21.
- Wu, Z.; Burns, J.K. (2004).** A β -galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission in 'Valencia' orange (*Citrus sinensis*). *J. Exp. Bot.* 55: 1483-1490.

- Yamaki, S.; Machida, Y.; Kakijuchi, N. (1979).** Changes in cell wall polysaccharides and monosaccharides during development and ripening of Japanese pear fruit. *Plant Cell Physiol.* 20: 311-321.
- Yamaoka, T.; Chiba, N. (1983).** Changes in the coagulating ability of pectin during the growth of soybean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 24: 1281-1290.
- Yamasaki, Y.; Konno, H. (1987).** Wall-bound α -glucosidase of suspension-cultured rice cells. *Phytochem.* 26: 711-713.
- Yap, Y.M.; Loh, C.S.; Ong, B.L. (2008).** Regulation of flower development in *Dendrobium crumenatum* by changes in carbohydrate contents, water status and cell wall metabolism. *Sci. Hortic.* 119: 59-66.
- Yokoyama, R.; Nishitani, K. (2000).** Functional diversity of xyloglucan-related proteins and its implications in the cellwall dynamics in plants. *Plant Biol.* 2: 598-604.
- Yokoyama, R.; Rose, J.K.C.; Nishitani, K. (2004).** A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. *Plant Physiol.* 134: 1088-1099.
- Yoon, J.H.; Ajisaka, K. (1996).** The synthesis of galactopyranosyl derivatives with β -galactosidase of different origins. *Carbohydr. Res.* 292: 153-163.
- York, W.S.; Oates, J.E.; van Halbeek, H.; Darvill, A.G.; Albersheim, P.; Tiller, P.R. Dell, A. (1988).** Location of the *O*-acetyl substituents on a nonasaccharide repeating unit of sycamore extracellular xyloglucan. *Carbohydr. Res.* 173: 113-132.
- Yoshioka, H.; Kashimura, Y.; Kaneko, K. (1994).** Solubilization and distribution of neutral sugars residues derived from polyuronides during the softening in apple fruit. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 63: 173-182.
- Zablackis, E.; Huang, J.; Müller, B.; Darvill, A.G.; Albersheim, P. (1995).** Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiol.* 107: 1129-1138.
- Zandleven, J.; Beldman, G.; M. Bosveld, M.; Schols, H.A.; Voragen, A. (2006).** Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using XGH. *Carbohydr. Polym.* 65: 495-503.
- Zhan, D.; Janssen, P.; Mort, A.J. (1998).** Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin. *Carbohydr. Res.* 308: 373-380.
- Zhang, G.F.; Staehelin, L.A. (1992).** Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. Immunocytochemical analysis of high pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol.* 99: 1070-1083.
- Zhang, Z.; Pierce, M. L.; J. Mort, J.A. (2007).** Changes in homogalacturins and enzymes degrading them during cotton cotyledon expansion. *Phytochem.* 68: 1094-1103.
- Zykwinska, A.; Thibault, J.F.; Ralet, M.C. (2007).** Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *J. Exp. Bot.* 58: 1795-1802.