

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA
Y FISIOLÓGÍA VEGETAL**

ÁREA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL



**Análisis funcional de dos β -galactosidasas de
Cicer arietinum (β I-Gal y β V-Gal) y tres
 β -galactosidasas de la subfamilia a1 de
Arabidopsis thaliana (BGAL1, BGAL3 y BGAL5)
y sus efectos en la estructura de la pared celular**

María Moneo Sánchez

2016

	Pg
Introducción	1
Resultados y Discusión	
Sección I: Análisis funcional de β-galactosidasas de <i>Cicer arietinum</i>	
Resultados	12
Discusión	17
Sección II: Análisis funcional de la subfamilia a1 de β-galactosidasas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	
Resultados	21
Discusión	26
Sección III: Producción de β-galactosidasas en sistemas heterólogos	
Resultados	31
Discusión	32
Conclusiones	35
Bibliografía	38

Introducción

Las β -galactosidasas (EC 3.2.1.23) se caracterizan por su capacidad de hidrolizar residuos β -D-galactosil del extremo no reductor de los β -D-galactósidos. Se incluyen en 4 familias de enzimas glicósido hidrolasas (GH) (GH1, 2, 35 y 42). Los miembros de la familia GH35 pueden presentar las actividades β -galactosidásica, exo- β -glucosaminidásica, exo- β -(1,4)-galactanásica y β -(1,3)-galactosidásica y se encuentran tanto en procariontas como en eucariotas, si bien el 70 % de las enzimas de esta familia se encuentran en plantas (Jefferson y col., 1987).

En plantas superiores, las β -galactosidasas pertenecientes a la familia GH35 están codificadas por familias multigénicas. Todas estas proteínas presentan la secuencia correspondiente al posible sitio activo de la familia GH35: G-G-P-[LIVM](2)-x-x-Q-x-E-N-E-[FY]. La mayoría de las β -galactosidasas vegetales presentan una región fuertemente hidrofóbica en su extremo amino terminal (N-terminal), (King y Davies, 1995; Smith y Gross, 2000; Kotake y col., 2005; Martín y col., 2005; 2008; 2009; Figueiredo y col., 2011), y uno o más posibles sitios de glicosilación (Smith y col., 1998; Smith y Gross, 2000; Esteban y col., 2005; Ahn y col., 2007; Tanthanuch y col., 2008; Liu y col., 2013). Además de su localización en la pared celular, las β -galactosidasas podrían también encontrarse en el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, las vacuolas, la membrana celular, el citoplasma, los cloroplastos, las mitocondrias o los lisosomas (Tanthanuch y col., 2008; Hobson y Deyholos, 2013; Liu y col., 2013). Las β -galactosidasas extracelulares se extraen de la pared celular con altas concentraciones de sales, lo que significa que están asociadas a la misma por enlaces iónicos. Se ha propuesto que las β -galactosidasas se agrupan en 2 clases en función de su actividad: la clase I con actividad exo- β -(1,4)-galactanasa y que actuaría sobre las pectinas y

el XG, y la clase II con actividad sobre los enlaces β -(1,3) y β -(1,6) que actuarían sobre las AGPs (Kotake y col., 2005).

Las β -galactosidasas, que pertenecen a la familia GH35, presentan un amplio rango de pesos moleculares (PM). Se han aislado β -galactosidasas relativamente pequeñas, con un PM entre 23.71 y 60 kDa y por otra parte, se han descrito β -galactosidasas con un PM cercano a 75 kDa en garbanzo (Esteban y col., 2005). Otras presentan PM más altos, mayores incluso de 100 kDa.

En función del tamaño de la proteína codificada se han establecido 2 grupos de β -galactosidasas de pared celular. El grupo 1 incluye las que tienen entre 721 y 731 aminoácidos, como tres de las cuatro descritas en garbanzo (Esteban y col., 2005) o 6 de las 17 descritas en arabis (Ahn y col., 2007). El grupo 2 incluye proteínas de un tamaño notablemente mayor, de entre 832 y 888 aminoácidos, como la β I-Gal de garbanzo (Esteban y col., 2005), las codificadas por 9 de los 17 clones aislados en arabis (Ahn y col., 2007). El mayor tamaño de las proteínas de este grupo se debe, principalmente, a la presencia de aproximadamente 100 aminoácidos en su extremo carboxilo terminal (C-terminal), presentando en esta zona residuos conservados, en particular siete residuos de cisteína característicos de los dominios similares a lectinas descritos en distintas especies animales (Ozeki y col., 1991; Honoso y col., 1999), que sugiere una capacidad similar para unirse a carbohidratos. La presencia de este dominio podría permitir la unión específica de las β -galactosidasas a determinados azúcares, incrementando así la eficiencia en la liberación de galactosa, aunque aún no se ha podido establecer de forma inequívoca su significado funcional (Trainotti y col., 2001; Ahn y col., 2007).

El pH óptimo para la actividad β -galactosidásica es variable en las distintas enzimas, pero generalmente suele ser entre 3.0 y 5.0 (Dopico y col., 1990a; Ross y col., 1994; Smith y Gross, 2000; Kotake y col., 2005). Las β -galactosidasas son inhibidas por mercurio (Hg^{2+}) (Yamasaki y Konno, 1987; Sekimata y col., 1989; Dopico y col., 1990a).

Función de las β -galactosidasas en el desarrollo vegetal

Las β -galactosidasas de plantas participan en numerosos procesos fisiológicos a lo largo del desarrollo vegetal donde distintas isoformas pueden actuar en diferentes fases del mismo. En concreto, las β -galactosidasas que se encuentran en la pared celular se han relacionado con la degradación de los polímeros de la misma durante el crecimiento en longitud de órganos vegetativos (Tanimoto y Pilet, 1978; Konno y col., 1986a; b; Dopico y

col., 1990b), el desarrollo y la maduración de los frutos (Ross y col., 1993; Kang y col., 1994; Ali y col., 1998) o la movilización de reservas (de Alcántara y col., 1991; King y Davies, 1995).

En numerosas ocasiones se ha establecido una relación entre las β -galactosidasas y el **crecimiento** en dicotiledóneas y se ha postulado que las β -galactosidasas participan en los procesos de modificación de los polisacáridos pécticos de la pared celular durante este proceso (Masuda y col., 1985; Konno y col., 1986a; Dopico y col., 1990b) y en la rotura de enlaces entre polisacáridos que tiene lugar durante el proceso de desensamblaje de la pared celular (Keegstra y Albersheim, 1970; Murray y Bandurski, 1975).

Dentro de los polisacáridos pécticos, los AGs son determinantes de las propiedades mecánicas de la pared celular (Katsu y Kamisaka, 1983) y el RGI con cadenas laterales de AGs, juega un papel importante en las propiedades viscoelásticas de la misma (Sakurai y col., 1987a; b). Las modificaciones en galactanos y AGs durante el crecimiento están mediadas por la acción de las β -galactosidasas, como se ha descrito en garbanzo (Dopico y col., 1989; 1990a).

Las β -galactosidasas también intervienen en el proceso autolítico de las paredes celulares, que podría reflejar las modificaciones de la pared celular durante la extensión.

Por otra parte, algunas β -galactosidasas de lino presentan altos niveles de transcritos asociados al engrosamiento de la pared celular secundaria, concretamente en diferentes estadios del desarrollo de las fibras del floema y del xilema durante el crecimiento del tallo y raíces (Roach y col., 2011; Hobson y Deyholos, 2013).

Las β -galactosidasas también se han relacionado con el desarrollo de frutos, especialmente en los primeros estadios del desarrollo, cuando se produce un crecimiento celular importante que determina el aumento de tamaño del mismo. La degradación de las cadenas laterales de AGI por las β -galactosidasas afecta tanto a la solubilidad como al tamaño molecular de las pectinas. Por tanto, la capacidad de estas enzimas para modificar las pectinas es importante en estados de desarrollo del fruto en los que éstos están creciendo rápidamente y se sintetiza nuevo material de la pared celular.

Las β -galactosidasas también son responsables de determinadas modificaciones del XG, polisacárido hemicelulósico con un papel fundamental en la expansión de la pared celular. Sampedro y col. (2012) han demostrado que el gen *AtBGAL10* es el único miembro descrito de la familia de β -galactosidasas de *Arabidopsis* capaz de actuar sobre el XG.

Además de su papel en el crecimiento de los frutos, también se ha descrito la actuación de diversas β -galactosidasas en la **maduración** de los mismos. Diversos estudios pusieron de manifiesto que en frutos de diferentes especies se produce una marcada pérdida de residuos galactosil durante la maduración (Knee, 1978; Gross y Wallner, 1979; Yamaki y col., 1979; Redgwell y col., 1992; Yoshioka y col., 1994) y posteriormente identificando genes, se purificaron diversas isoformas de β -galactosidasas relacionadas con el proceso de ablandamiento de los frutos. También se ha demostrado la implicación de las β -galactosidasas en la **movilización de reservas** tras la germinación de las semillas, actuando sobre polisacáridos de pared celular con función de reserva, como son los XGs y los galactanos.

Finalmente, también se ha demostrado la participación de las β -galactosidasas en la **senescencia** y la **abscisión**, procesos en los que se produce una fuerte modificación del componente polisacárido de la pared celular condicionado por variaciones en la actividad y síntesis de diversas enzimas hidrolíticas de la misma (Brown, 1997; Patterson, 2001; Brummell y col., 2004).

β -D-galactosidasas de *Cicer arietinum*

Los genes *CarBGal1*, *CarBGal3*, *CarBGal4* y *CarBGal5* de garbanzo 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 identidad, tanto entre ellas como con respecto a las otras 2 β -galactosidasas de garbanzo.

Las β III-Gal, β IV-Gal y β V-Gal presentan una secuencia hidrofóbica en el extremo N-terminal, que al ser eliminadas de la secuencia dan lugar a proteínas maduras de 77.9, 78.0 y 80.0 kDa, que por su tamaño pertenecen al grupo 1 de β -galactosidasas establecido por Ahn y col. (2007), con pls teóricos de 8.06, 5.79 y 8.45, respectivamente. La proteína β I-Gal también presenta un péptido señal en el extremo N-terminal y un pl 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). Todas las β -galactosidasas muestran al menos un sitio de N-glicosidación. Las 4 β -galactosidasas de garbanzo se localizan en la pared celular (Martín y col., 2008; 2009; 2011; 2013) y su localización específica, junto con el análisis de la

acumulación de los transcritos, a lo largo del crecimiento y en distintos órganos ha ayudado a relacionarlas con distintas etapas del desarrollo, aunque la función específica de cada una de ellas no está aun establecida.

Los genes *CarBGal1* y *CarBGal4* presentan un patrón de acumulación de transcritos muy similar, indicando en ambos casos una relación con momentos del desarrollo en los que la tasa de elongación es baja. Así, presentan mayores niveles en estados más avanzados del crecimiento de los epicotilos, aumentando progresivamente con la edad de los mismos, (Esteban y col., 2005). Las proteínas β I-Gal y β IV-Gal se acumulan 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 y colénquima, las fibras del floema o los elementos conductores, tanto del floema como del xilema (Martín y col., 2008; 2011).

El gen *CarBGal3* codifica la proteína β III-Gal responsable del proceso de autólisis *in vitro* de paredes celulares de epicotilos de garbanzo (Dopico y col., 1989; 1990a) actuando sobre un arabinogalactano de la fracción péctica de la pared celular (Dopico y col., 1990b). Además, *in vivo*, la β III-Gal es capaz de hidrolizar las cadenas de galactano de las paredes celulares de tubérculos de patata que sobreexpresan el gen *CarBGal3*, lo que confirma su actuación sobre el componente pectídico de la pared celular y permite que estas paredes adquieran capacidad autohidrolítica (Esteban y col., 2003; Martín y col., 2005).

Los transcritos *CarBGal3* se acumulan en los momentos de máximo crecimiento de órganos elongantes y disminuyen al reducirse este proceso (Esteban y col., 2003; 2005), no detectándose en órganos no elongantes (Esteban y col., 2005). Dentro de su actuación en la pared celular durante el desarrollo, la β III-Gal parece tener un papel fundamental en la diferenciación del floema primario, dada su localización exclusiva en los elementos conductores de este tejido en los tallos, que coincide con la reducción de galactano observada en este tipo celular. La β III-Gal parece intervenir en las etapas iniciales de diferenciación del xilema primario y de las fibras del floema, (Martín y col., 2013), tejidos en los que podría actuar de manera coordinada con la β I-Gal y la β IV-Gal, si bien están en etapas posteriores del desarrollo (Martín y col., 2008; Martín y col., 2011).

Finalmente, *CarBGal5* presentan la máxima acumulación de sus transcritos en los momentos iniciales del desarrollo y en regiones que se caracterizan por presentar tejido meristemático (Esteban y col., 2005; Hernández-Nistal y col., 2006). La inmunolocalización de la proteína β V-Gal confirman su presencia en estados tempranos del desarrollo y en

órganos en crecimiento activo (Martín y col., 2009). La β -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 (Martín y col., 2009).

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). El grupo mayoritario es la subfamilia a1 que está formada por 6 miembros (BGAL1, BGAL2, BGAL3, BGAL4, BGAL5, y BGAL12) (Tanthanuch y col., 2008; Gantulga y col., 2009). En este trabajo nos centramos en el estudio de la subfamilia a1 ya que es la que tiene mayor similitud de secuencia con las β -galactosidasas de garbanzo.

Respecto a su tamaño, tienen un PM entre 80.6 y 93.7 kDa y una longitud entre 724 y 856 aminoácidos. En función de su tamaño las β -galactosidasas BGAL2, 4, 5 y 12 pertenecen al grupo 1 y las BGAL1 y BGAL3 al grupo 2, 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 estas β -galactosidasas presentan un péptido señal en su extremo N-terminal y un pI básico, superior a 8 en todos los casos, excepto BGAL1 (7.23). La presencia de un péptido señal y su pI básico apuntan a su localización en la pared celular (Ahn y col., 2007) y a la posibilidad de estar unidas a la misma por enlaces iónicos. Las predicciones bioinformáticas sitúan a 4 de ellas en la pared celular (BGAL1, 2, 4 y 12) y a dos en el retículo endoplasmático (BGAL3 y 5), si bien la localización exacta deberá determinarse empíricamente. Finalmente, todas estas BGAL, a excepción de BGAL3 y BGAL5 presentan sitios de N-glicosilación.

Estas enzimas pueden actuar sobre sustratos derivados de la pared celular, contribuyendo con su actuación a la dinámica de la misma. Su expresión en sistemas heterólogos eucariotas ha permitido determinar que todas ellas 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, el fucopiranosido. Presentan un máximo de actividad con el sustrato artificial pnp- β -D-galactopiranosido a pH entre 4.0-4.5 y a temperaturas cercanas a 40 °C. Además, las 6 isoenzimas son capaces de hidrolizar los enlaces β -(1,4) y β -(1,3) de galactooligosacáridos y además la isoenzima

BGAL12 es la única capaz de hidrolizar los enlaces β -(1,6) (Ahn y col., 2007; Gantulga y col., 2008; 2009).

En nuestro grupo de investigación, hemos encontrado que los transcritos de los 6 genes *AtBGAL* de la subfamilia a1, se detectan en mayor o menor medida a lo largo de todas las etapas de desarrollo y en todos los órganos analizados, aunque con diferencias en sus niveles que apuntan a una regulación diferencial de cada uno de ellos (Izquierdo, 2015). 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 este proceso. Por otra parte 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 (Izquierdo, 2015).

Los datos recogidos en la literatura sobre la acumulación de las proteínas BGAL no coincide, en todos los casos, con los niveles de transcrito, lo que puede deberse a que los procesos postranscripcionales y postraduccionales contribuyen de manera importante a la regulación de la cantidad de estas enzimas (Gantulga y col., 2009). BGAL1 y BGAL12 se acumulan de forma preferente en la raíz, principalmente en las zonas elongantes y asociadas a las células del xilema (Gantulga y col., 2009). Por otra parte, la proteína BGAL2 se mantiene a niveles bajos y constantes en los diferentes órganos de la planta (Gantulga y col., 2008), mientras que BGAL5 se acumula de forma preferente en órganos verdes, como las hojas caulinares, las hojas de roseta y el tallo floral (Gantulga y col., 2008).

Nuestro grupo de investigación abordó el estudio de la actividad de los promotores de los genes *AtBGAL* de la subfamilia a1 de β -galactosidasas (Albornos y col., 2012). Se estableció que *pAtBGAL1*, 3 y 4 muestran un patrón de actividad similar, muy alta en células y órganos en expansión que desciende con la edad (Albornos y col., 2012), y los resultados indican una implicación de las proteínas correspondientes en la remodelación de la pared celular en cotiledones, hojas, botones florales y flores. La actividad del *pAtBGAL2* muestra una clara relación con la elongación del hipocotilo de plántulas crecidas en luz y oscuridad y se detectó también durante la expansión de cotiledones, hojas de roseta y caulinares. Su actividad es intensa en los primeros estadios del desarrollo de flores y frutos. El *pAtBGAL5*,

por el contrario, es el único que se encuentra activo en los tricomas a lo largo de todo el desarrollo de la planta, indicando una alta especificidad de la proteína BGAL5 y su implicación en los cambios de la pared celular que acompaña a la formación de los tricomas. La actividad del *pAtBGAL5* fue también alta en radículas y raíces, excepto en las zonas meristemáticas de estos órganos, y durante la formación de las semillas. Finalmente, la actividad del promotor *pAtBGAL12* se detecta principalmente en zonas meristemáticas tales como primordios foliares, raíces secundarias emergentes y semillas en desarrollo (Albornos y col., 2012), lo que sugiere una función en los procesos de diferenciación.

Estos resultados indican que las β -galactosidasas de *Arabidopsis* pueden actuar en diferentes funciones o intervenir en el desarrollo concreto de un determinado tejido y/u órgano, sin descartar la acción coordinada de alguna de estas enzimas. Sin embargo, en la actualidad, todavía no se conoce con exactitud la función en el desarrollo de estas β -galactosidasas.

Planteamiento de trabajo

La presencia en plantas de familias génicas que codifican β -galactosidasas indica la existencia de numerosas isoformas, que pueden ser producidas en diferentes órganos y/o momentos del desarrollo y podrían realizar funciones específicas. La mayoría de las β -galactosidasas vegetales actúan en la remodelación de la pared celular en diferentes procesos fisiológicos, si bien el/los sustratos de cada una de ellas en esta estructura, así como su función en el desarrollo de la planta no están totalmente esclarecidos.

El objetivo general de este trabajo es determinar la función de 2 miembros de la familia génica de β -galactosidasas de garbanzo (β I-Gal y β V-Gal) y de 3 β -galactosidasas de *Arabidopsis*, codificadas por genes de la subfamilia α 1 (*AtBGAL1*, *AtBGAL3* y *AtBGAL5*), en el desarrollo de la planta, estableciendo cómo actúan en la pared celular y las posibles alteraciones que pueden sufrir 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). Además, y para llevar a cabo estudios de especificidad de sustrato, se producirán en un sistema heterólogo para obtener en gran cantidad de manera que, posteriormente, puedan realizarse estudios de especificidad de sustrato.

El objetivo general se ha dividido en 3 grandes objetivos específicos:

Objetivo 1: Estudiar la función de las β -galactosidasas de *Cicer arietinum*: β I-Gal y β V-Gal.

Cuatro miembros de la familia génica de β -galactosidasas en *C. arietinum* han sido ampliamente caracterizados, como se ha expuesto en la introducción de esta memoria, aunque la función específica de las mismas aún no está determinada. Para avanzar en el conocimiento de dos de estas proteínas, y considerando que *C. arietinum*, cuyo genoma se ha secuenciado recientemente, es una especie muy difícil de transformar genéticamente, se decidió utilizar la planta modelo *A. thaliana* de la que existen numerosas herramientas moleculares y se puede transformar genéticamente. Los datos que se tienen hasta el momento apuntan a que las β -galactosidasas de garbanzo actúan sobre las pectinas de la pared celular y que podrían estar implicadas en procesos de relajación y/o endurecimiento de la misma. Por consiguiente, la producción de las β -galactosidasas de garbanzo en plantas de *Arabidopsis* podría causar alteraciones en la morfología de las plantas y en la estructura de sus paredes celulares, que nos permitiera asociar estas proteínas con una función concreta. Así, nuestro objetivo es estudiar la función de las proteínas β I-Gal y β V-Gal de garbanzo, mediante la expresión en *Arabidopsis* de los genes que las codifican.

Para realizar este objetivo se construirán plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresen los genes *CarBGal1* y *CarBGal5* de garbanzo, que codifican las proteínas β I-Gal y β V-Gal, respectivamente. Considerando que el lugar en que se localiza una proteína a nivel celular determina el rango de sus funciones, se establecerá la localización subcelular de las proteínas producidas, analizando si se localizan en la pared celular, mediante la producción de plantas transgénicas que sobreexpresen las proteínas β I-Gal de garbanzo fusionadas a la proteína verde fluorescente (eGFP).

Posteriormente, se analizarán las posibles variaciones morfológicas que provoca la producción de las proteínas en las plantas transgénicas y se determinarán las modificaciones que la sobreexpresión de las β -Gal de garbanzo causan en las paredes celulares de *Arabidopsis*. Los cambios en la composición en azúcares neutros de las paredes celulares se analizarán por cromatografía de gases y la estructura de los polisacáridos de la pared por espectroscopía FTIR. Las alteraciones en el contenido de los distintos polisacáridos se analizarán mediante técnicas inmunológicas con anticuerpos específicos.

Objetivo 2: Estudiar la función de β -galactosidasas de *Arabidopsis thaliana*.

Los 6 genes que forman la subfamilia $\alpha 1$ de la familia génica de las β -galactosidasas de *Arabidopsis* codifican proteínas que se localizan en la pared celular, y para las que se ha postulado una actuación como exogalactanasas sobre los polisacáridos pécticos de la pared celular remodelando la misma durante el desarrollo, aunque no se conoce la función específica de cada una de ellas. Estas proteínas presentan gran similitud de secuencia con las β -galactosidasas de *C. arietinum*, por lo que la comparación de los resultados obtenidos entre los objetivos 1 y 2 de este trabajo podría permitirnos establecer si alguna de estas enzimas de *Arabidopsis* es ortólogo funcional de las β -galactosidasas de garbanzo.

Se establecieron los siguientes objetivos específicos:

a. Analizar la acumulación de los transcritos *AtBGAL* en distintas condiciones de crecimiento.

El análisis comparativo entre los niveles de transcritos *AtBGAL* cuando la planta está sometida a tratamientos que inducen el crecimiento o que reflejan situaciones de estrés nos ayudará a relacionar cada miembro de la familia con los procesos en los que podría participar.

Para desarrollar este objetivo se determinarán por sqRT-PCR (transcripción reversa acoplada a PCR semicuantitativa) los niveles de cada transcrito en plántulas de *A. thaliana*, evaluando los cambios producidos en la acumulación de transcritos cuando la planta crece en presencia de distintos fitorreguladores u otras sustancias relacionadas con el crecimiento, las interacciones bióticas y el estrés abiótico.

b. Estudiar la función de las proteínas *BGAL1*, *BGAL3* y *BGAL5* de la subfamilia $\alpha 1$, mediante el análisis de mutantes de pérdida de función (*knockout*).

La eliminación de la producción de una determinada proteína mediante la mutación del gen que la codifica puede causar alteraciones en las plantas mutantes que nos indiquen la función que dicha proteína realiza en la planta WT. En el caso de las β -galactosidasas de pared celular es de esperar que los mutantes presenten alteraciones en la composición y estructura de la misma, aunque hay que considerar la posible redundancia funcional debido a la presencia de hasta 17 β -galactosidasas en *Arabidopsis*. Este objetivo se ha centrado en el estudio de tres de las seis β -galactosidasas de la subfamilia $\alpha 1$: *BGAL1*, *BGAL3* y *BGAL5*.

Para realizar este objetivo se utilizarán, en primer lugar, mutantes sencillos en los genes *AtBGAL1*, *AtBGAL3* y *AtBGAL5* que codifican las tres proteínas seleccionadas.

Posteriormente y, para evitar una posible redundancia funcional entre las β -galactosidasas de *arabidopsis*, se generarán dobles mutantes *bgal1/bg3*. La elección del doble mutante se hace en base a la actividad los promotores de sus genes (Albornos y col. 2012).

En todos los mutantes, se analizarán las posibles variaciones morfológicas que presenten a lo largo del desarrollo y se determinarán las modificaciones que la mutación de los genes que codifican las BGAL causan en la actividad β -galactosidásica de la pared celular, para comprobar si la redundancia funcional afecta a la actividad enzimática específica, y en la composición y estructura de las paredes celulares. Los análisis se realizarán de la misma forma que en el objetivo 1

c. Estudiar la función de las proteínas BGAL1, BGAL3 y BGAL5 de la subfamilia a1, mediante el análisis de plantas que las sobreexpresen.

Al igual que en el objetivo 1, se generarán plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresen los genes que codifican las proteínas BGAL1, BGAL3 y BGAL5 de *arabidopsis*, lo que nos permitirá profundizar en el conocimiento de la función de estas enzimas e intentar establecer si son ortólogas de las β -galactosidasas de garbanzo estudiadas en este trabajo.

El análisis de las posibles alteraciones morfológicas de las plantas transgénicas y de sus paredes celulares se realizará como en el objetivo 1.

Objetivo 3: Producción de β -galactosidasas en sistemas heterólogos.

El establecimiento del sustrato específico sobre el que actúan los diferentes miembros de las familias génicas de β -galactosidasas en cada especie vegetal, así como la determinación de su características bioquímicas son aspectos importantes para el conocimiento de su función. Para ello, es requisito previo disponer de las proteínas activas en suficiente cantidad, produciéndolas en un sistema adecuado. Así, nuestro objetivo es producir las 4 β -galactosidasas de *C. arietinum* y las 6 β -galactosidasas de la subfamilia a1 de *A. thaliana*.

Para alcanzar este objetivo, se utilizarán tres abordajes o metodologías diferentes, comparando resultados y estableciendo posteriormente el más adecuado para una mejor producción de las proteínas de interés:

-Producir las β -galactosidasas en un sistema procariota, en concreto *Escherichia coli*, que permita una clonación y una producción rápida.

-Producir las β -galactosidasas en un sistema vegetal que genere gran cantidad de biomasa, utilizando cultivos celulares de células indiferenciadas de *A. thaliana* que se obtendrán a partir de las plantas transgénicas generadas en el objetivo 1 de este trabajo.

-Expresar de manera transitoria las ORFs de las β -galactosidasas en hojas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración, utilizando un vector que permite una transcripción de alto rendimiento.

Resultados y discusión

Sección I: Análisis funcional de β -galactosidasas de *Cicer arietinum*

Resultados

La sobreexpresión de proteínas en plantas transgénicas es una metodología que permite el estudio de la función de las mismas, analizando los cambios fenotípicos que se producen en la planta. Se construyeron plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan las ORFs *CarBGal1* y *CarBGal5* de *C. arietinum* bajo el control del promotor fuerte y constitutivo del gen 35S del CaMV (*p35S*) en los vectores binarios pK7WG2 y pGWB2, respectivamente. Estos vectores se introdujeron en *A. tumefaciens* por electroporación y se transformó *A. thaliana* con estas agrobacterias mediante el método de inmersión floral. Además, para comprobar que la proteína producida en este sistema vegetal se dirige a la pared celular, se construyeron plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan la proteína β -Gal de *C. arietinum* fusionada a la eGFP dirigida por el mismo promotor constitutivo. Para este estudio se utilizó el vector binario pKFWG2 y se siguieron los pasos anteriormente comentados. El estudio mediante microscopía confocal determinó que la proteína β -Gal-eGFP se localiza en la pared celular de las plantas de arábidopsis.

Para el análisis fenotípico de las plantas 35S:: β -Gal se analizaron el número de inserciones mediante *Southern Blot* en la T2 y los niveles de transcrito por sqRT-PCR en la T3 seleccionándose las líneas 3.5.4 de las 35S:: β -Gal y la 3.13.2 de 35S:: β V-Gal por poseer una única inserción y altos niveles de transcrito.

Morfológicamente no se encontraron diferencias entre el WT y las líneas transgénicas seleccionadas en ninguno de los órganos ni estadios del desarrollo analizados. El análisis de la distribución de polisacáridos de pared celular mediante espectroscopía FTIR permitió establecer diferencias entre las plántulas de 3 d transgénicas y el WT crecidas en oscuridad en el componente principal 2 (PC2) que acumula un máximo de 14.83 % de la varianza. Los datos parecen indicar una menor representación de β -D-(1,4)-galactano, restos de galactosa y arabinosa y HG en 35S:: β I-Gal. Las 35S:: β V-Gal podrían tener menor representación de HG, ác. urónicos, arabinoglucuronoxilanos y galactomananos.

Se estudió la composición de la pared celular de órganos en distinto estado de desarrollo utilizando anticuerpos específicos de pared celular y realizando un ELISA sobre 3 fracciones de pared celular distintas. Respecto al análisis de las distintas fracciones de hipocotilos de 4 y 7 d se encontró que la mayor parte del β -D-(1,4)-galactano se solubilizaba en la fracción H₂O, mientras que el HG se extrajo preferentemente con CDTA. El β -D-(1,4)-galactano presentó en el WT valores más altos a los 4 d que a los 7 d en la fracción H₂O. La planta transgénica presentó más β -D-(1,4)-galactano a los 4 d en la fracción H₂O en comparación con el WT, a los 7 d, en cambio, los valores son ligeramente inferiores. Por otra parte, los niveles de HG (LM18) en el WT son mayores a los 4 d que a los 7 d en la fracción H₂O. En los hipocotilos 35S:: β V-Gal a los 4 d se observaron descensos evidentes de HG en las fracciones H₂O y CDTA, mientras que en el KOH apareció un incremento notorio. A los 7 d también apareció un descenso en CDTA a la vez que un incremento en H₂O y KOH, siempre en relación al WT.

De manera general en todos los órganos adultos de las tres plantas, en la fracción H₂O y en CDTA estuvieron representados todos los polisacáridos analizados en mayor o menor medida. La fracción KOH se encontró enriquecida en XG mientras que el resto de epítomos apenas estuvieron representados. Los resultados obtenidos en las plantas WT en los 2 entrenudos analizados, indicaron que la fracción H₂O de los entrenudos en crecimiento estaba más enriquecida en β -D-(1,4)-galactano, α -L-(1,5)-arabinano y HG metilesterificado (LM18, JIM7 y LM20) que la de los entrenudos basales. En la fracción CDTA el β -D-(1,4)-galactano y el α -L-(1,5)-arabinano presentaron niveles similares entre los dos entrenudos, sin embargo el HG esterificado fue más abundante en los entrenudos basales. Por último, en la fracción KOH todos los polisacáridos estudiados presentaron niveles similares en los entrenudos del WT, estando esta fracción enriquecida en XG (LM25).

Si comparamos los entrenudos (tanto apical como basal) de las plantas transgénicas con el WT, las mayores diferencias las encontramos en el caso de las plantas 35S:: β I-Gal. En estas plantas hay una ligera reducción de β -D-(1,4)-galactano soluble en H₂O y una reducción notable en CDTA, tanto en el entrenudo apical como en el basal. En la fracción de KOH, en cambio, hay un ligero incremento en el entrenudo apical y un ligero descenso en el basal. La señal asociada al LM6 descendió en las fracciones de CDTA de los dos entrenudos. El LM13 por el contrario, mostró una señal mucho mayor en la fracción H₂O del entrenudo apical. Los niveles de LM19 estuvieron menos representados en la fracción H₂O de ambos entrenudos de las plantas transgénicas, mientras que JIM7 y LM20 en esta fracción fueron extremadamente superiores en ambos entrenudos. El HG reconocido por LM18 mostró descensos en las 3 fracciones del entrenudo apical de las plantas 35S:: β I-Gal, mientras que en el entrenudo basal hubo un incremento en la fracción H₂O y un ligero descenso en la de CDTA. También fueron destacables los cambios en el XG, con valores inusualmente altos en la fracción H₂O de los entrenudos 35S:: β I-Gal apicales y muy reducidas respecto al WT en las fracciones CDTA y KOH en ambos entrenudos.

Por otra parte, las plantas 35S:: β V-Gal presentaron menos variaciones. El nivel de β -D-(1,4)-galactano en los entrenudos apicales fue ligeramente inferior en la fracción H₂O de las plantas transgénicas 35S:: β V-Gal, mientras que en la de CDTA se produjo un descenso notorio y en la de KOH hubo un aumento de casi 3 veces con respecto al WT. En los entrenudos basales, en la fracción H₂O se observó un ligero aumento respecto al WT y en las otras dos fracciones la tendencia fue la misma que la hallada en los entrenudos apicales. La señal del LM6 fue ligeramente menor en la fracción H₂O de los entrenudos apicales y mayor en los basales. En las otras dos fracciones los resultados fueron similares entre los dos entrenudos analizados, esto es, apareció un descenso muy acusado en la fracción de CDTA en comparación con el WT y niveles similares en la de KOH, siempre en relación al WT. El arabinano lineal (LM13) solo presentó valores más reducidos en el entrenudo basal de 35S:: β V-Gal. Las alteraciones del HG fueron más moderadas en estas plantas transgénicas. En el entrenudo en crecimiento se observó un ligero aumento en las fracciones de agua y KOH, mientras que en la fracción de CDTA el descenso observado fue notable. En el 1º entrenudo también se detectó un aumento de HG en la 1ª fracción analizada siendo en este órgano casi el doble. Los niveles de XG (LM25) variaron muy poco en los entrenudos transgénicos 35S:: β V-Gal. Cabe destacar el descenso de más de un 50 % en la fracción de CDTA de los entrenudos apicales y los sutiles aumentos en las fracciones de agua y KOH de los entrenudos más maduros.

En el 2º par de hojas de roseta del WT los niveles de los distintos polisacáridos en cada una de las fracciones fueron muy similares a los observados en los entrenudos. En las hojas de las plantas 35S:: β I-Gal se observaron descensos de β -D-(1,4)-galactano en agua y CDTA. Por el contrario, en KOH, se observó un aumento muy acusado. El α -L-(1,5)-arabinano mostró niveles inferiores con todos los anticuerpos usados exceptuando en KOH donde el nivel es similar al WT. Como ocurriera en los entrenudos los epítomos reconocidos por JIM7 y LM20 están mucho más representados en la fracción de agua. El HG no mestilesterificado (LM19), en cambio, desciende al 50 % y el LM18 únicamente varía en la fracción de CDTA, disminuyendo. El XG disminuyó su representación en la fracción de CDTA.

En las plantas 35S:: β V-Gal se observó una representación ligeramente mayor del LM5 y LM6 en las fracciones de agua y CDTA. El LM19 sufrió un descenso acusado y el LM18 está mucho más representado en esta fracción y en la de CDTA.

Finalmente, el análisis de las fracciones de la pared celular de raíces, mostró una vez más un patrón en el WT similar al encontrado en los entrenudos. De nuevo en las plantas 35S:: β I-Gal en relación al WT se detectaron marcados descensos en los epítomos reconocidos por LM5, LM6 y LM13, y LM18 y LM19, tanto en H₂O como en CDTA, aunque JIM7 y LM20 estuvieron mucho más representados en H₂O. Por último, LM25 en este órgano estaba más representado en H₂O pero menos en CDTA y KOH en comparación con el WT.

Las plantas 35S:: β V-Gal presentaron variaciones más moderadas que las que presentaron las plantas 35S:: β I-Gal. Cabe destacar aumentos discretos en LM5 (H₂O y CDTA) y descensos más notables LM6, JIM7 y LM18 en la fracción H₂O.

Se completo el estudio de composición por órganos con EDC. La proporción de los diferentes polisacáridos en las 3 fracciones fue similar a la mencionada en el apartado anterior. En el entrenudo apical de las plantas 35S:: β I-Gal se observaron niveles más bajos de todos los epítomos analizados en la fracción H₂O en comparación con el WT. En la fracción de CDTA las disminuciones fueron más evidentes que en la fracción anterior utilizando los anticuerpos LM5, BR12 y JIM7. Cabe destacar que en esta fracción la subpoblación más neutra de XG que aparece en el WT, no se detectó en las plantas 35S:: β I-Gal, apareciendo una subpoblación en la zona ligeramente ácida. En la última fracción únicamente aparecieron señales para el manano y para el XG, cuyas partes más ácidas se vieron claramente reducidas en las plantas transgénicas y la población de glucuronoxilano (LM28) desapareció.

En cuanto a los entrenudos basales, se observó una tendencia similar a la encontrada en los apicales. En la fracción KOH, las dos subpoblaciones de LM11 y LM28 desaparecieron en las plantas 35S:: β I-Gal y las curvas del LM21 y del XG se vieron muy reducidas en la parte más ácida de las mismas.

En las hojas cabe destacar que en la fracción CDTA hay un descenso generalizado de todos los polisacáridos en las plantas transgénicas en comparación con el WT. En la fracción KOH se observa que el pico correspondiente al LM21 detectado en las plantas WT aparece desdoblado en dos en las plantas transgénicas.

Tras analizar las raíces de las plantas 35S:: β I-Gal se advirtió que en la fracción H₂O todos los polisacáridos estaban menos representados que en el WT. La fracción de CDTA exhibió disminuciones de los polisacáridos reconocidos por LM5, BR12, RU2 y LM18. Por último la población de manano se desdobló en dos y desaparecieron las subpoblaciones neutras del xilano y glucuronoxilano que aparecieron en el WT.

Aparecieron diferencias en las proporciones de los polisacáridos en el WT según se analizaron los hipocotilos a los 4 d (en crecimiento activo) o a los 7 d (crecimiento casi finalizado). Así, los valores obtenidos con LM19, JIM7, LM25 y LM21 fueron más altos a los 4 d que a los 7 d, mientras que los de RU2 fueron mucho mayores a los 7 d. Los hipocotilos 35S:: β V-Gal a los 4 d presentaron una población de RU2 incipiente, sin embargo, las poblaciones de HG estaban muy reducidas. El análisis de los hipocotilos transgénicos produjo un perfil idéntico al observado en el WT en la fracción de CDTA a los 4 d si bien los valores obtenidos fueron mayores en todos los casos. Comparando la fracción de KOH de las plantas transgénicas 35S:: β V-Gal de 4 d con el WT, se vio que el XG, el HG y el RGI no esterificado estaban más representados. Los cambios encontrados a los 7 d siguieron la misma tendencia que a los 4 d.

Los distintos análisis realizados hasta el momento indicaron variaciones en la composición de las paredes celulares de las plantas 35S:: β I-Gal y 35S:: β V-Gal en comparación con el WT. Por ello, se decidió analizar si se producían cambios en la distribución de los polisacáridos de la pared celular mediante técnicas de inmunolocalización sobre cortes histológicos y, en las plántulas 35S:: β V-Gal también sobre raíces completas.

Las diferencias más notables en los hipocotilos de 4 d entre las plantas WT y 35S:: β V-Gal se observaron en las secciones marcadas con RU2 (RGI). En los cortes 35S:: β V-Gal se observó un incremento de la señal en la epidermis y en el parénquima y un descenso en el tejido

vascular. El anticuerpo LM25 (XG) presenta una intensidad de marcaje incrementa sus niveles en la planta transgénica en las células de la epidermis.

En el entrenudo más apical, la intensidad del marcaje con el LM5 es alta y homogénea en todos los tejidos, aunque solo se encuentran diferencias evidentes entre el WT y las plantas transgénicas 35S:: β I-Gal, con fluorescencia reducida. El marcaje con BR12 y LM10 en las plantas 35S:: β I-Gal presenta niveles inferiores de intensidad para estos polisacáridos.

En el análisis de la distribución de los anticuerpos en el entrenudo más basal, se encontró que el LM5 en las plantas 35S:: β I-Gal y 35S:: β V-Gal este epítipo está menos representado que en el WT. Por otra parte, el marcaje con el anticuerpo RU2, es ligeramente más intenso. El epítipo reconocido por LM18 muestra en las plantas 35S:: β I-Gal y 35S:: β V-Gal niveles ligeramente superiores en las fibras interfasciculares y notablemente menores en el parénquima medular y cortical. El marcaje con JIM7 y LM20 aumenta en las plantas transgénicas.

En el segundo par de hojas el anticuerpo LM5 en las plantas transgénicas muestran un evidente descenso de la fluorescencia. Únicamente las plantas 35S:: β I-Gal presentan variaciones en los niveles de α -L-(1,5)-arabinano. En las 35S:: β V-Gal se observa un reducción de la fluorescencia asociada al RU2. Finalmente el LM18 muestra variaciones en las plantas transgénicas, con una fluorescencia superior.

El último órgano analizado fueron las raíces. En las plantas transgénicas, el marcaje con RU2 está claramente disminuido.

Para completar la caracterización de las plántulas 35S:: β V-Gal analizamos la zona más distal de las radículas de plantas de 10 d mediante la inmunolocalización en superficie. En las raíces de las plantas transgénicas el marcaje del LM5 es mucho más intenso, sin embargo el del LM6 está notablemente reducido. El LM19 está mucho más representado en el ápice y en la zona de elongación de las raíces transgénicas que en las del WT.

Discusión

Las paredes celulares de las plantas 35S:: β I-Gal tienen menor cantidad de galactano (LM5) en comparación con el WT, siendo más evidente en las fracciones H₂O y CDTA. Como hemos indicado anteriormente, esta reducción en los niveles de galactano no se traduce en cambios en la morfología de las plantas, a pesar de la implicación de este polímero en las propiedades mecánicas de la pared celular (McCartney y col., 2000; 2003; Ha y col., 2005), como pone de manifiesto la menor cantidad de galactano en el 1^{er} entrenudo (con pared

celular más rígida) que en el 3^{er} entrenudo en las plantas WT, hecho observado en distintas especies (Labavitch y Ray, 1974; Nishitani y Massuda, 1981; Jung y Engels, 2002; Martín y col., 2013). La ausencia de cambios morfológicos puede deberse a mecanismos de compensación por otros polímeros de la pared celular, como se ha demostrado en tubérculos de patata transgénica, en los que la reducción de galactano por la producción de una β -galactosidasa vegetal (Martín y col., 2005) o una endogalactanasa fúngica (Sorensen y col., 2000), se acompañó de un incremento del HG en el primero de los casos y del contenido en ácido galacturónico del RGI en el segundo, indicando que estos aumentos contrarrestan el efecto que pudiera tener la reducción de galactano en la pared celular, evitando alteraciones morfológicas.

Las plantas 35S:: β I-Gal también presentan alteraciones en el HG con respecto al WT, dependiendo del grado de metilesterificación del HG y de la fracción de pared celular analizada. El grado de metilesterificación del HG determina en gran medida las propiedades mecánicas de la pared celular. Así, en los entrenudos que ya no se elongan disminuye la cantidad de HG altamente esterificado (reconocido por JIM7 y LM20) reflejando la importancia de eliminar estos restos metilo para obtener paredes celulares rígidas (Jian y col., 2005; Hongo y col., 2012). En las plantas 35S:: β I-Gal tanto los epítomos reconocidos por LM18 (HG parcialmente esterificado) como por el LM19 (HG no esterificado), presentan niveles inferiores al WT en las fracciones H₂O y CDTA en todos los órganos analizados, mientras que el HG con alto grado de esterificación (reconocido por JIM7 y LM20) presenta niveles superiores al WT en la fracción H₂O. El aumento de HG altamente esterificado en plantas 35S:: β I-Gal, con respecto al WT podría reflejar un mecanismo de compensación mecánica frente a la pérdida de galactano. Esto estaría indicando un cambio biosintético desde un tipo de polisacárido a otro (Willats y col., 2001) o un cambio en las proporciones entre el HG altamente esterificado y parcialmente o nada esterificado.

Se ha establecido que el galactano disminuye en paredes celulares que han dejado de crecer y que durante la diferenciación de fibras de lino, algodón o en el floema del garbanzo hay un metabolismo muy activo de galactano (Gorshkova y col., 1996; 2005; Morvan y col., 2003; Martín y col., 2008; Singh y col., 2009). Más recientemente, se ha propuesto que el galactano puede contribuir a la resistencia mecánica de la pared por su interacción directa con la celulosa en fibras de chopo (Gorshkova y col., 2015) e incluso se ha visto que la regulación de sus niveles es determinante en la formación de fibras en *arabidopsis* (Gondolf y col., 2014). La producción de β I-Gal lleva a una pérdida de galactano en las fibras interfasciculares en las plantas 35S:: β I-Gal con respecto al WT indicando un metabolismo

actividad del galactano también en el entrenudo basal de *Arabidopsis*, con las implicaciones que pudiera tener en la estructura de la pared celular. Esta disminución de galactano se ha visto compensada por un aumento de HG parcialmente metilesterificado (LM18) que, como se ha comentado anteriormente, es determinante en el aumento de rigidez de la pared celular (Hongo y col., 2009). Sin embargo, esta compensación entre pérdida de galactano y aumento de HG parcialmente esterificado no es un fenómeno general en el desarrollo de las plantas 35S:: β -Gal. De hecho, se observa una reducción de este HG (LM18) en las células del parénquima de los entrenudos y un incremento en las células del mesófilo en las hojas, aunque en ambos tipos celulares tiene lugar el descenso de galactano. Por otra parte, las discrepancias en la acumulación del HG con alto grado de metilesterificación (LM20) que disminuye en el parénquima medular del 3^{er} entrenudo de las plantas 35S:: β -Gal con respecto al WT, apuntan a que la regulación de los niveles de HG y su grado de metilesterificación en las plantas transgénicas 35S:: β -Gal depende del órgano o incluso del tipo celular concreto, sin que se pueda establecer un patrón determinado en relación a las modificaciones inducidas por la β -Gal, como indican también los perfiles EDC. En este sentido se debe tener en cuenta la flexibilidad funcional del HG, ya que un mismo nivel de metilesterificación de este polímero se ha relacionado tanto con fenómenos de aumento de rigidez como de relajación de la pared celular dependiendo del órgano o tejido (revisado recientemente por Bidhendi y Geitmann, 2016).

Diferentes trabajos defienden la interacción directa entre las pectinas y el XG (Cumming y col., 2005; Popper y Fry, 2008; Franková y Fry, 2013) lo que coincide con los resultados obtenidos en todos los órganos analizados de plantas WT de *Arabidopsis*, ya que se ha detectado la presencia de XG (LM25) en las fracciones H₂O y CDTA, típica de pectinas, en todos los órganos analizados. Así, una de las dos subpoblaciones del XG, la que eluye más tardíamente y por tanto tiene características más ácidas, coeluye de forma clara con el HG en todos sus estados de metilesterificación (LM19, LM18, JIM7 y LM20) y con el RGI (RU2) y sus cadenas laterales de arabinano (BR12, LM13) y galactano (LM5). Además, los perfiles EDC en la fracción CDTA ponen de manifiesto que la reducción en los niveles de XG entre el 3^{er} y el 1^{er} entrenudo en plantas WT se debe a la desaparición de la subpoblación neutra (de elución más temprana) en el 1^{er} entrenudo, detectándose únicamente la subpoblación de XG que interacciona con las pectinas. Por otra parte podemos destacar que en las raíces de plantas WT, se ha detectado en la fracción KOH una subpoblación adicional de XG ligeramente menos ácida que la que coeluye con las pectinas, y que se podría corresponder

con las moléculas de XG que contienen ácido galacturónico implicadas en el crecimiento de los pelos radiculares (Peña y col., 2012).

Así, la producción de la β I-Gal de garbanzo en plantas de *arabidopsis* causa importantes alteraciones tanto en el contenido de XG de sus paredes celulares como en su distribución. La marcada disminución, ya mencionada, del galactano asociado al RGI en la fracción CDTA, provoca la desaparición de la subpoblación de XG que interacciona con las pectinas y la aparición de una subpoblación en una zona de elución más temprana, que podría interaccionar con componentes menos ácidos de la pared. En cultivos celulares de *arabidopsis* (Popper y Fry, 2008) y en tallos etiolados de guisante (Cumming y col., 2005) se ha postulado que la interacción entre las pectinas y el XG se produce principalmente por medio de las cadenas laterales neutras del RGI, bien durante la síntesis de XG y de las cadenas de arabinano y galactano, o bien directamente en la pared celular. Nuestros resultados apoyan la segunda propuesta, al establecer que es la pérdida de galactano en las propias paredes celulares de las plantas 35S:: β I-Gal, lo que causa una pérdida de interacción del XG con el componente péctico.

En las plantas 35S:: β I-Gal, la reducción en la población más neutra del XG de la fracción KOH se acompaña por la completa desaparición de xilano (LM11)/glucuronoxilano (LM28) (se observa especialmente en entrenudos basales) lo que implicaría que estas paredes celulares deberían presentar una menor rigidez que las correspondientes paredes celulares del tipo WT, aunque no se observen cambios morfológicos evidentes. En otros casos, como en el mutante *irx8* de *arabidopsis* que presenta niveles reducidos de xilano y HG, esto conlleva defectos severos a nivel de pared celular secundaria (Persson y col., 2005; 2007). Se ha propuesto que la proteína IRX8 estaría implicada en la síntesis de algún polisacárido péctico que controle la deposición de hemicelulosas (Persson y col., 2007; Hao y Mohnen, 2014), por lo que la correcta deposición de xilanos dependería de la integridad del resto de la pared celular. En plantas WT de *arabidopsis*, los mayores niveles de xilanos aparecen en las fibras interfasciculares, y es este mismo tejido el que presenta las mayores variaciones en las paredes celulares de las plantas 35S:: β I-Gal (reducción de galactano, aumento del HG). Por tanto, la ausencia de xilanos en la fracción KOH de las plantas transgénicas puede deberse a su falta de deposición por cambios en la integridad de la pared celular; a una mayor interacción con el componente péctico o incluso con la subpoblación de XG detectada en la fracción CDTA de las plantas 35S:: β I-Gal, aunque esta hipótesis deberá ser confirmada.

Las paredes celulares de plantas 35S:: β V-Gal no presentaron una disminución en los niveles de galactano (LM5) con respecto al WT tan generalizada como en las 35S:: β I-Gal. Únicamente se observó una reducción clara en las fracciones H₂O y CDTA del 3^{er} entrenudo y en la CDTA del 1^o, si bien solo se pudo confirmar *in muro* sobre cortes histológicos de los entrenudos basales, en los que resulta llamativo que la reducción de galactano sea muy marcada en las fibras interfasciculares, al igual que ocurría en las plantas 35S:: β I-Gal. Por otra parte, en las hojas de la roseta, en las que no se aprecian variaciones en los niveles de galactano respecto al WT en ninguna de las fracciones analizadas, sí se observa una reducción en el marcaje con el anticuerpo LM5 *in muro*. Es posible que la subpoblación de galactano cuya reducción detectada *in muro*, sea la que menos interacciona con otros componentes de la pared celular y por eso se detecta más fácilmente en estudios de inmunolocalización.

A parte de esa disminución no generalizada del galactano en las plantas 35S:: β V-Gal no se han detectado grandes variaciones en las paredes celulares de estas transgénicas salvo la reducción del arabinano reconocido por LM6 (pentasacárido de α -(1,5)-L-arabinano) en ambos entrenudos y el incremento del HG parcialmente esterificado (LM18) en el entrenudo basal y en las hojas. Esta última variación se encuentra principalmente en las fibras interfasciculares de los entrenudos y en el mesófilo de las hojas que es precisamente donde la reducción del galactano es muy acusada, lo que coincide con lo encontrado en las plantas 35S:: β I-Gal. Así, al menos en estos tipos celulares concretos, la reducción de galactano puede estar siendo compensada por un aumento en los niveles de HG parcialmente metilesterificado.

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

Resultados

La acumulación de transcritos se analizó en plántulas de 4 d expuestas a distintos tratamientos (relacionados con el crecimiento y desarrollo, y con el estrés biótico y abiótico) con respecto a las plantas control crecidas en condiciones normales. El IAA y las GA produjeron una disminución de algunos de los transcritos, mientras que se incrementaron otros. La aplicación de BL produjo un aumento significativo de los transcritos. En el caso de *AtBGAL12* la aplicación conjunta de IAA con BL produjo un efecto sinérgico, el tándem BL y H₃BO₃ también provocó aumentos de *AtBGAL12*. El tratamiento con ZR aumentó los niveles

de la mayoría *AtBGAL*. Cuando las plántulas se trataron con ABA, ET y SA se produjo un incremento de los transcritos. La hormona que provocó cambios más drásticos fue el MeJA provocando reducciones muy severas.

Decidimos profundizar en el estudio de la subfamilia $\alpha 1$ de β -galactosidasas de arabidopsis, utilizando mutantes *knockout* por inserción de T-DNA de los genes *AtBGAL1*, *AtBGAL3* y *AtBGAL5*. Una vez seleccionadas las líneas homocigotas para la inserción, se analizó por RT-PCR la ausencia de transcritos de cada uno de los genes *AtBGAL* en los mutantes correspondientes.

Se realizó un estudio comparativo respecto a las plantas WT a nivel morfológico pero no fue posible detectar cambios respecto a sus correspondientes WTs en ninguno de los órganos de la planta durante todas las fases de desarrollo, tanto vegetativo como reproductor.

La cantidad de pared celular y de proteína por mg de pared celular extraída obtenida en cada uno de los mutantes no presentó variaciones significativas respecto a los correspondientes WTs. La actividad β -galactosidásica en los extractos proteicos obtenidos de paredes celulares de plántulas de 10 d de los mutantes y sus correspondientes WTs también presentaron niveles muy similares entre ellos.

Se valoró la capacidad autohidrolítica de las paredes celulares de plantas de 10 d crecidas en luz de cada uno de los mutantes y de sus WTs no observándose diferencias entre plantas. La liberación de azúcares (totales y reductores) de las paredes celulares extraídas de los mutantes y la caracterización de los mismos por cromatografía en fase gaseosa presentó valores similares entre plantas. El azúcar liberado en mayor proporción en todos los casos fue la galactosa, seguido de la arabinosa y, en menor medida, la glucosa y la ramnosa.

Las diferencias en los perfiles de absorción de los estudios de FTIR de cada mutante respecto a su WT en los mutantes *bgal* creciendo en luz presentan diferencias tanto en la región de la huella digital característica de los polisacáridos de la pared celular como en la región característica de los enlaces carboxílicos, enlaces fenólicos y grupos amino. Se realizó un análisis de componentes principales (PC) donde el PC2 permitió separar distintos grupos a pesar de que el porcentaje de varianza incluido es muy bajo.

El análisis de la composición en azúcares neutros de la fracción no celulósica de la pared celular de plántulas de 10 d crecidas en luz de los tres mutantes y sus WTs indicó que, en general, el azúcar mayoritario fue la galactosa, seguido de glucosa, arabinosa y en menor

medida y con porcentajes similares, xilosa y ramnosa. Se observaron algunas diferencias entre los *bgal* y sus WT, siendo las más acusadas las proporciones de glucosa.

La distribución del marcaje con el anticuerpo LM5 en el tallo (entrenado apical y basal) y en hojas de roseta de plantas de arabis no permitió establecer diferencias entre los mutantes *bgal* y sus WTs, ni a nivel anatómico, ni en la distribución de galactano.

Los niveles de transcritos de los genes *AtBGAL* de la subfamilia $\alpha 1$ en los mutantes *knockout* modifican su representación. Así, en el mutante *bgal1*, *AtBGAL3* y *AtBGAL5* aumentan. En *bgal3* se acumularon más todos los transcritos, en *bgal5*, en cambio, se produce una disminución en todos ellos.

Debido a la ausencia de cambios fenotípicos en los mutantes *bgal* nos planteamos la obtención de mutantes múltiples. Generamos un doble mutante *bgal1/bgal3* en homocigosis y comprobamos la ausencia de transcritos de los genes *AtBGAL1* y *AtBGAL3*.

En la comparación morfológica a lo largo del desarrollo entre las plántulas y plantas WT y las *bgal1/bgal3* se pudo apreciar que los hipocotilos del doble mutante presentaban una menor longitud respecto al WT, siendo las longitudes finales del 3^{er} y 4^o entrenado del tallo floral mucho menores en *bgal1/bgal3*.

Tras el estudio morfológico se procedió al estudio de los extractos proteicos obtenidos a partir de las paredes celulares de las plántulas de 10 d crecidas en condiciones de día largo, tanto del WT como del *bgal1/bgal3*. La cantidad de pared celular obtenida no presentó variaciones significativas respecto al WT pero si atendemos a la cantidad de proteína extraída por mg de pared celular, se puede ver que es ligeramente superior en el caso del doble mutante. Sin embargo, no se tradujo en diferencias en la actividad β -galactosidásica, puesto que en el WT y en *bgal1/bgal3* fueron muy similares.

Tras estos análisis, y teniendo en cuenta los cambios fenotípicos observados en el doble mutante *bgal1/bgal3*, se procedió a la caracterización de las paredes celulares extraídas de diferentes órganos y en distintos momentos del desarrollo, para intentar relacionar las posibles modificaciones en su composición y estructura con la función de las β -galactosidasas ausentes en estas plantas. Para ello se analizó la composición en azúcares neutros de las paredes celulares y se determinaron los niveles relativos y la distribución de los mismos por técnicas de inmunodetección.

Se identificaron los polímeros de la pared celular de plántulas *bgal1/bgal3* de 3 d crecidas en día largo y oscuridad mediante espectroscopía FTIR, al igual que se hizo con los mutantes

simples. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes. Por este motivo, decidimos analizar la composición en azúcares neutros de sus paredes celulares por cromatografía de gases. Al comparar los porcentajes del WT con los del doble mutante no se encontraron diferencias significativas.

Los cambios morfológicos encontrados sugerían diferencias en la composición de la pared celular del doble mutante, por lo que se decidió realizar un análisis más detallado utilizando anticuerpos específicos de distintos polisacáridos. Se extrajeron y fraccionaron las paredes celulares de diferentes órganos y se analizaron mediante ELISA y EDC

Las paredes celulares de hipocotilos de plántulas etioladas *bgal1/bgla3* de 2 y 4 d presentaron un aumento de galactano en relación al WT. A los 7 d, en cambio, apenas hay diferencias en los valores de este polisacárido entre *bgal1/bgla3* y el WT. La representación de HG en el doble mutante es muy superior a la del WT.

El perfil encontrado en los entrenudos en el doble mutante es muy similar al del WT. Únicamente destaca el claro descenso de LM6, una señal notablemente mayor en H₂O y ligeramente menor en CDTA del HG parcialmente esterificado y una clara disminución del XG en la fracción en CDTA que se vio acompañada por un aumento en la en KOH.

En el 2º par de hojas de roseta el nivel de β-D-galactano del doble mutante fue superior que en el WT. El HG no metilesterificado descendió ligeramente y el parcialmente esterificado fue mayor en el doble mutante. El XG presentó en estas plantas niveles ligeramente más bajos.

Finalmente, en el análisis de las fracciones de la pared celular de raíces se observaron aumentos de galactano de más de un 50 % en las fracciones en el doble mutante. Todos los epítomos asociados al HG disminuyen su presencia en las paredes celulares del mutante *bgal1/bgla3*.

Los estudios de EDC complementaron la información obtenida por ELISA. En los hipocotilos del doble mutante de 4 y 7 d se vieron incrementos de las señales de casi todos los epítomos analizados en la fracción H₂O. En la fracción KOH apareció una subpoblación ácida de XG que coelúa con el HG. En el entrenudo apical la señal de todos los epítomos sufrió disminuciones en comparación con las obtenidas en el WT. El valor alcanzado por el XG (LM25) en la fracción KOH fue superior en la zona ligeramente ácida en la que eluían las fracciones ligeramente ácidas en comparación con el WT, además en esta misma región, la población de glucuronoxilano (LM28) que apareció en el WT desaparece en *bgal1/bgla3*. A

pesar de las modificaciones encontradas en el componente polisacárido del entrenudo en crecimiento, en el entrenudo basal, no se encuentra ninguna variación en los perfiles de EDC del doble mutante en relación al WT. En las hojas cabe destacar que en el mutante la señal de LM5, LM18 y LM19 fue superior, así como en la zona de elución más ácida de la fracción soluble en CDTA.

Finalmente en la fracción H₂O de las raíces se evidenció un incremento en la señal del LM5 que se vio acompañada por un descenso de la del resto de. En la fracción CDTA el incremento de galactano en *bgal1/bgag3* fue el doble. En la fracción KOH la subpoblación neutra de xilano (LM11) en *bgal1/bgag3* desapareció, mientras que la ácida, incrementó su valor, resultado que se observó también con el glucuronoxilano (LM28).

Para completar la caracterización de las plántulas doble mutante se analizó la zona más distal de las radículas de plantas de 10 d crecidas en condiciones de día largo mediante la inmunolocalización en superficie. El marcaje del galactano (LM5) y del arabinano (LM6) se puede observar una reducción de la señal en el doble mutante. La señal del anticuerpo LM19 estuvo mucho más representada en el *bgal1/bgag3*. Por el contrario, el LM18 mostró un marcado descenso en todas las zonas de la raíz.

En los hipocotilos de plántulas etioladas de 4 d del doble mutante aumenta el marcaje de las cadenas laterales de azúcares neutros; el XG, al contrario, mostró niveles ligeramente inferiores en casi todos los tejidos. Cuando se analizó la zona más apical del 3^{er} entrenudo se vio un leve incremento en la señal del LM5 y BR12 en relación al WT. En el doble mutante, a diferencia del WT, el marcaje del LM20 está distribuido de forma uniforme en toda la pared celular. En los entrenudos basales apareció un leve descenso de β -D-(1,4)-galactano, RGI y HG esterificado en *bgal1/bgag3*. En las hojas de roseta se dio el incremento más notable en los niveles de β -D-(1,4)-galactano y un descenso en el marcaje asociado a RU2 (RGI). Estos cambios se vieron compensados por un descenso en los niveles de LM18. Por último, las raíces de las plantas *bgal1/bgag3* también mostraron un ligero incremento en los niveles de galactano en todos los tejidos.

Decidimos construir plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresaran las ORFs *AtBGAL1*, *AtBGAL3* y *AtBGAL5* de *A. thaliana* clonándolas en el vector pK7WG2 bajo el control del promotor *p35S* y analizar los cambios fenotípicos que se producen en las mismas. Estos vectores se introdujeron en *A. tumefaciens* por electroporación y se transformó *A. thaliana* con estas agrobacterias mediante el método de inmersión floral. Además, para comprobar que la proteína producida en este sistema vegetal se dirige a la

pared celular, se construyeron plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresaran estas proteínas fusionadas a la eGFP dirigida por el mismo promotor constitutivo. Para este estudio se utilizó el vector binario pKFWG2 (BGAL1-eGFP) y el pGWB5 (BGAL3-eGFP y BGAL5-eGFP) y se siguieron los pasos anteriormente comentados. El estudio mediante microscopía confocal determinó que estas enzimas se localizan en la pared celular de las plantas de arabis.

Para el análisis fenotípico de las plantas 35S::BGAL se analizaron el número de inserciones mediante *Southern Blot* en la T2 y los niveles de transcrito por sqRT-PCR en la T3 seleccionándose las líneas 1.12.2 de las 35S::BGAL1, la 1.11.2 de 35S::BGAL3 y 1.7.2 de las 35S::BGAL5 por poseer una única inserción y altos niveles de transcrito.

Morfológicamente no se encontraron diferencias entre el WT y las líneas transgénicas seleccionadas en ninguno de los órganos ni estadios del desarrollo analizados. El análisis de la distribución de polisacáridos de la pared celular no permitió establecer diferencias entre las plántulas de 3 d transgénicas y el WT crecidas en luz u oscuridad ni en el PC1 ni en el PC2 que acumulan ambos más del 99 % de la varianza.

En el análisis de la distribución de β -D-galactano *in muro* de los entrenudos de las tres plantas 35S::BGAL fue posible detectar una disminución de los niveles del mismo en las plantas transgénicas. Esta reducción es más evidente en las plantas 35S::BGAL1.

Discusión

El único aumento significativo en los niveles de transcritos de los genes *AtBGAL* tras el tratamiento con IAA, hormona directamente relacionada con procesos de elongación y expansión, se produce en *AtBGAL3* (y en menor medida *AtBGAL12*), mientras que en el resto de genes *AtBGAL* (a excepción de *AtBGAL5*) los transcritos descienden tras la aplicación de auxinas. A pesar de la clara relación de las auxinas con la elongación de los tallos (Stepanova y col., 2008), no se ha relacionado previamente a la proteína BGAL3 con este proceso. Sin embargo, sí podría reflejar su implicación en la elongación del hipocotilo, a lo que apuntaba también el hecho de que el promotor *pAtBGAL3* sea activo en la base de los hipocotilos en plántulas etioladas de 5 d (Albornos, 2011), zona en la que la elongación es más acusada al comenzar el crecimiento de este órgano (Gendreau y col., 1997). El efecto inductor del IAA en los transcritos *AtBGAL3* también apoyaría la propuesta relación de la proteína BGAL3 con la expansión en los cotiledones tras la germinación, proceso modulado por las auxinas (Lewis y col., 2009) y con la expansión inicial de las hojas

(Albornos y col., 2012; Izquierdo, 2015). En estos órganos, las auxinas regulan la especificación y la diferenciación de los primordios foliares en su etapa de división (Ljung y col., 2001) y controlan el desarrollo de los tejidos vasculares (Sieburth, 1999; Mattsson y col., 2003), sin que se haya demostrado de forma inequívoca la participación de esta hormona en el control de la expansión de hojas (Keller y col., 2004).

Los transcritos *AtBGAL4* presentan una fuerte inducción tras el tratamiento con BL y son los únicos que muestran una clara inducción por H_3BO_3 , aunque sorprende que el tratamiento conjunto con estas dos sustancias apenas tenga efecto. Se conoce desde hace años el papel del boro en el desarrollo de los elementos conductores del xilema, en la lignificación y, de forma general, en procesos que coinciden al aumento de la rigidez de la pared celular por su capacidad de unión al RGII (Lewis, 1979; Lovatt, 1985; Ishii y col., 1999). Se ha visto que no solo la aplicación conjunta de H_3BO_3 con BL puede tener efectos en la fisiología de la planta (Kubo y col., 2005) sino que aplicado de forma individual, también puede inducir la expresión de determinados genes relacionados con el metabolismo de la pared celular (Surgun y Bürün, 2015). Trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro grupo han relacionado la proteína BGAL4 con el aumento de rigidez de la pared celular y el cese de elongación, estando los transcritos *AtBGAL4* especialmente representados en el entrenudo más basal del tallo floral o en las hojas totalmente expandidas (Izquierdo, 2015) y la actividad del promotor frecuentemente asociada al cilindro vascular en el hipocotilo y las raíces (Albornos y col., 2012). Además, *AtBGAL4* presenta una clara inhibición durante la inducción del crecimiento mediada por compuestos volátiles orgánicos producidos por rizobacterias (Zhang y col., 2007) y su promotor presenta cierta actividad asociada a las fibras interfasciculares del tallo floral (Koizumi y col., 2009). Todo esto, unido al hecho de que los transcritos *AtBGAL4* son los que presentan una mayor represión por IAA, llegando a ser la mitad que en el control correspondiente, nos permite afirmar que la proteína BGAL4 interviene en las modificaciones de la pared celular que conducen al aumento de rigidez.

Por último, al igual que en *AtBGAL3*, se observa una fuerte reducción de los transcritos *AtBGAL5* y especialmente, *AtBGAL12* tras el tratamiento con MeJA. De hecho, es la única hormona a la que responde *AtBGAL5*. En este sentido, los resultados obtenidos de las variaciones de niveles de transcrito *AtBGAL5* por diferentes sustancias no permiten apuntar una posible función para la proteína BGAL5, salvo si consideramos que la actividad del promotor de este gen es muy alta en la zona de elongación de la raíz (Albornos y col.,

2012) y el MeJA es un inhibidor del crecimiento de este órgano (Staswick y col., 1992), por lo que el efecto de esta hormona sobre el gen *AtBGAL5* estaría más relacionado con el proceso de crecimiento que con la defensa. Así, BGAL5 podría ser responsable de las modificaciones de la pared celular que conduzca a la elongación de la raíz, lo que se apoya igualmente por la ausencia de efecto inductor del IAA sobre los transcritos correspondientes. Respecto al *AtBGAL12*, los resultados son más complejos de interpretar, ya que si bien su promotor también es muy activo en la zona de elongación de la raíz (Albornos y col., 2012), los niveles de sus transcritos se ven aumentados tanto por factores inductores del crecimiento, como inhibidos por el MeJA, lo que claramente lo relaciona con el proceso de crecimiento. Pero además los transcritos *AtBGAL12* se ven incrementados por ABA o ET, también inhibidores en algunos procesos del crecimiento (Vanstraelen y Benková, 2012), por lo que no podemos descartar la implicación de proteína BGAL12 en distintos mecanismos de respuesta a las plantas frente a condiciones adversas, sobre todo considerando los bajos niveles de transcritos *AtBGAL12* que se observan durante el desarrollo de *Arabidopsis* en condiciones basales (Izquierdo, 2015) y su fuerte inducción por todos los tratamientos relacionados con el estrés.

La caracterización fenotípica del doble mutante *bgal1/bgal3* (una vez obtenido y llevado a homocigosis) puso de manifiesto que la ausencia de las proteínas BGAL1 y BGAL3 produce una reducción de la longitud de los órganos en crecimiento activo, como son los hipocotilos (de manera más acusada en los más jóvenes) y los entrenudos más apicales del tallo floral. No se detectaron cambios morfológicos en las hojas ni en los cotiledones, a pesar de que, como se ha discutido anteriormente, ambas β -galactosidasas parecen relacionadas con la expansión de estos órganos. El papel de estas proteínas en la elongación del hipocotilo se encuentra apoyada en el hecho de que los promotores *pAtBGAL1* y *pAtBGAL3* son activos en la base de los hipocotilos en plántulas etioladas de 5 d (Albornos, 2011), como se ha dicho, zona con elongación muy acusada (Gendreau y col., 1997), y a que los transcritos *AtBGAL3* se inducen por IAA y BL, hormonas directamente relacionadas con la elongación.

Los cambios morfológicos apuntaban a que se estuvieran produciendo cambios en las paredes celulares del doble mutante *bgal1/bgal3* que produjeran esa inhibición del crecimiento. Aunque los primeros análisis no permitieron apreciar diferencias notables entre la pared celular del doble mutante y el WT, un análisis más detallado mediante técnicas inmunológicas nos permitió establecer importantes diferencias. Entre ellas el

aumento generalizado del β -D-(1,4)-galactano (LM5) que se acompaña de cambios diversos en función del órgano analizado y de su grado de desarrollo.

Las paredes celulares de hipocotilos de plántulas etioladas de 2 y 4 d, que presentan un crecimiento muy activo y cuya longitud se reduce de forma evidente en el doble mutante, presenta los cambios más acusados en su composición. En estas paredes celulares se ha detectado un marcado incremento en los niveles de galactano (LM5) que es muy acusado en la epidermis, tejido clave en el control de la elongación (Bret-Harte y Talbott, 1993). Estos resultados nos permiten afirmar que las cadenas de galactano son cruciales para determinar el crecimiento de los hipocotilos de *arabidopsis*, como ya había sido propuesto en epicotilos y tallos de garbanzo (Seara y col., 1988; Martín y col., 2013) de tal manera que cuando se limita su hidrólisis, sobre todo, en la epidermis, su crecimiento disminuye, indicando que es necesario que estos polímeros se degraden para que el crecimiento se produzca. Además, es la supresión de *BGAL1* y *BGAL3* lo que conduce a este incremento en galactano, lo que indica que este es su sustrato en la pared celular, como ya se había determinado para otras β -galactosidasas (Buckeridge y col., 2000; Martín y col., 2005).

Además, a medida que la tasa de crecimiento del hipocotilo es menor, las paredes celulares del doble mutante se enriquecen en XG, especialmente de aquellos que eluyen al comienzo de la aplicación del gradiente salino. En la pared celular de los hipocotilos de más edad aparece incluso una subpoblación ácida de XG que no aparece en el WT y que coeluye con HG con bajo grado de metilesterificación (LM19) y con RGI (RU2), polímeros mucho más abundantes en el doble mutante. El conjunto de cambios observados en la pared celular de los hipocotilos del doble mutante contribuyen a su menor longitud, indicando además que el galactano juega un papel importante en las interacciones del XG con el resto de componentes de la pared celular. De hecho, y como comentaremos más adelante, las alteraciones de las paredes celulares del 3^{er} entrenudo de las plantas *bgal1/bgal3*, que también presenta una menor longitud respecto al WT, apuntaron igualmente en esta dirección.

Cuando se analizan plantas adultas, el aumento de galactano del doble mutante solo se detecta claramente en las hojas y las raíces, lo que concuerda con los altos niveles de transcritos *AtBGAL1* y *AtBGAL3* y de actividad de los promotores correspondientes en estos órganos (Albornos y col., 2012; Izquierdo, 2015). Sin embargo, el resto de polisacáridos en hojas y raíces, no presentan variaciones tan acusadas como en los hipocotilos, hecho igualmente observado en los análisis EDC.

El cambio más destacable en las paredes celulares de entrenudos del doble mutante es el aumento de una subpoblación más ácida de XG (LM25) en la fracción KOH del tercer entrenudo con respecto al WT, al igual que en los hipocotilos. Además, es especialmente significativo que esta subpoblación más ácida de XG solo se detecte en los órganos de las plantas *bgal1/bgal3* en los que se observa reducción del crecimiento, los hipocotilos y el 3^{er} entrenudo, y no se observe en las raíces y las hojas, en los que también se produce un aumento de galactano, lo que nos permite afirmar que esta subpoblación de XG que se produce en respuesta a la pérdida de actividad BGAL1 y BGAL3 está directamente implicada en el control de la elongación.

Se ha descrito previamente que las cadenas laterales neutras del RGI podrían interactuar de forma directa tanto con las microfibrillas de celulosa (Zykwinska y col., 2005) como con el XG (Cosgrove, 2009; Popper y Fry, 2008), por lo que algunos autores han propuesto que podría existir una competencia directa entre las pectinas y el XG por su unión a la celulosa (Park y Cosgrove, 2015). Considerados de forma conjunta, los resultados recogidos en las Secciones I y II de esta memoria apoyarían la hipótesis de que son las cadenas laterales neutras las que podrían estar modulando las interacciones entre los distintos polisacáridos de la pared celular. Así, el hecho de disponer de dos sistemas vegetales para modificar las cadenas de galactano en sentidos opuestos, reducirlas en el caso de las plantas 35S:: β -Gal de *C. arietinum* y aumentarlas en el caso de las plantas *bgal1/bgal3*, nos permite precisar el posible papel de este polisacárido en la arquitectura de la pared celular. Teniendo en cuenta la correlación entre los niveles de XG detectados en la fracción KOH en los dos tipos de plantas (disminuidos en las plantas que sobreproducen la β -Gal y aumentados respecto al WT en el doble mutante y ambos en la misma zona del gradiente de elución), podemos afirmar que el galactano, y en consecuencia las β -galactosidasas, son claves en el control de la organización de los distintos dominios de la pared celular y estarían regulando el grado de interacción no solo entre las pectinas y el resto de polisacáridos, sino también entre las hemicelulosas y la celulosa, jugando un papel clave en el crecimiento vegetal.

En este punto y, como una herramienta adicional para determinar la función de estas β -galactosidasas y el papel de sus posibles sustratos en la organización estructural en distintos momentos del desarrollo, decidimos generar plantas transgénicas de arabidopsis que sobreprodujeran las proteínas BGAL1, BGAL3 y BGAL5 (35S::BGAL1, 35S::BGAL3 y 35S::BGAL5, respectivamente).

Tras seleccionar las plantas transgénicas de inserción única que presentaban los mayores niveles de transcrito procedimos con la caracterización de las mismas. A pesar de que no se detectaron diferencias morfológicas ni cambios en los espectros FTIR de las paredes celulares de plántulas de 3 d entre las plantas 35S::BGAL y el WT, un primer análisis sobre la distribución de β -D-(1,4)-galactano (LM5) *in muro* sí apunta a cambios en la pared celular inducidas por la sobreproducción de las distintas proteínas BGAL. De forma general se detecta una disminución en la señal del anticuerpo LM5 en las plantas 35S::BGAL, especialmente marcada en el entrenudo basal, si bien cada una de las 3 plantas transgénicas generadas presenta un patrón de marcaje diferente. Dependiendo de la proteína producida, la reducción de galactano respecto al WT es más acusada en un tipo celular concreto, como en las células parenquimáticas de las plantas 35S::BGAL1 y 35S::BGAL3, o en los tejidos vasculares o las fibras interfasciculares en 35S::BGAL5. Así, la acción de las diferentes BGAL dependería de la estructura concreta de la pared celular en los diferentes tipos celulares, lo que a su vez podría depender de su distinta composición y de la posible especificidad de sustrato de estas proteínas, como se ha propuesto para las proteínas β I-Gal y β V-Gal (Sección I), lo que en caso de confirmarse ayudará a esclarecer la función de estas proteínas y las interacciones de sus sustratos con el resto de componentes de la pared celular.

Sección III: Producción de β -galactosidasas en sistemas heterólogos

Resultados

Para ahondar en el estudio de la función de cada una de las β -galactosidasas tanto de garbanzo como de *Arabidopsis* analizadas en este trabajo, sería necesario determinar su sustrato en la pared celular, lo que hace imprescindible obtenerlas en cantidad suficiente y de forma activa para lo que se precisa producirlas en algún sistema heterólogo

En un principio se intentó producir la proteína β I-Gal de garbanzo utilizando un organismo procarionta como *E. coli*. Para poner a punto el sistema se clonó la ORF *CarBgal1* en el vector de expresión pET28a(+) y se transformó con él la cepa bacteriana Rosetta™(DE3). Mediante electroforesis en SDS-PAGE se pudo determinar que el máximo de producción de β I-Gal se produce a las 3 horas tras la inducción con IPTG, aunque ésta aparece en la fracción correspondiente a los cuerpos de inclusión (IB). Los IB se solubilizaron mediante su resuspensión en Na-acetato 20 mM pH 5 con urea 2 M, concentraciones más

bajas precipitaban los IB. Esta concentración era demasiado elevada para llevar a cabo los estudios de actividad enzimática, lo que nos impidió comprobar la actividad β -galactosidásica de β I-Gal en el extracto proteico y pasamos a la siguiente aproximación.

En este caso, la puesta a punto del sistema, se realizó a partir de plantas de *arabidopsis* WT, 35S:: β I-Gal y 35S:: β V-Gal. La inducción de la división celular en los explantos permitió obtener numerosos callos en aproximadamente un mes, si bien los callos procedentes de las plantas transgénicas de *arabidopsis* presentaron un aspecto menos friable y más marrónáceo.

La cantidad total de proteína es mucho mayor en el medio de cultivo que en el callo o paredes celulares aisladas. En el WT la cantidad de proteína es mayor que en las muestras 35S:: β I tanto en el medio de cultivo como en los callos, sin embargo, en las CW purificada es menor. Tras realizar una electroforesis en SDS-PAGE se encontró que en ninguno de los casos se observa una banda que presentara el tamaño estimado para la β I-Gal (90.3 KDa). La actividad β -galactosidásica en los extractos 35S:: β I-Gal es notablemente menor que en el WT.

Como última aproximación se clonaron las ORFs de las distintas β -galactosidasas de garbanzo y *arabidopsis* en el vector pEAQ y posteriormente se transformó la cepa AGL1 de *A. tumefaciens* que se utilizaría para la infiltración de las hojas de *N. benthamiana*.

Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* y se recogieron a los 4, 6 y 12 d tras la misma. Los niveles de producción de las distintas β -galactosidasas en los distintos tiempos analizados muestran fluctuaciones entre ellos. A los 4 d tras la infiltración únicamente se detectan bandas diferenciales en los análisis por SDS-PAGE correspondientes a β III-Gal, β IV-Gal, BGAL2 y BGAL4. Cuando se retrasa la recogida de las hojas hasta los 6 d tras la infiltración, las proteínas que se producían a los 4 d aumentan de cantidad y además es posible detectar bandas correspondientes a β I-Gal, β V-Gal, BGAL1 y BGAL5. Finalmente, retrasar la recogida de la hoja hasta los 12 d tras la infiltración no favorece la producción de ninguna proteína. Además, los valores de actividad específica más altos de las 4 β -galactosidasas de garbanzo se corresponden con las mayores cantidades de proteína detectada en la electroforesis.

Discusión

Nuestro grupo de investigación ha establecido que la β III-Gal de garbanzo presenta actividad sobre los polisacáridos pécticos hidrolizando el enlace β -(1,4)-Gal (Dopico y col., 1990b; Martín y col., 2005). Sin embargo, se desconocía la actividad de las enzimas β I-, β IV-

y β V-Gal, y por otra parte, no disponíamos de un sistema para producir estas proteínas activas a gran escala, por lo que decidimos abordar este objetivo utilizando una o dos β -galactosidasas de garbanzo para la puesta a punto del sistema de producción.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, decidimos desarrollar como primera estrategia, la producción de la β I-Gal de garbanzo en *E. coli*, utilizando una cepa que resolviera el problema de los codones preferentes que ocurre cuando se quieren producir β -galactosidasas vegetales en organismos procariotas (B. Dopico, comunicación personal). Sin embargo, tras varios intentos de optimización del método, la β I-Gal siempre se acumula como cuerpos de inclusión, lo que no sirve para nuestros estudios ya que el plegamiento irregular de esta proteína la inactiva. En estos casos es posible disgregar los cuerpos de inclusión con altas concentraciones de urea y su eliminación lenta y progresiva por diálisis secuencial facilitaría el correcto replegamiento de la proteína (Yamaguchi y Miyazaki, 2014). No obstante, esta aproximación no funcionó con la β I-Gal ya que se formaron de nuevo estos agregados cuando redujimos la concentración de urea por debajo de 2M. Por lo tanto, este sistema fue descartado, a pesar de que se ha descrito como válido para la expresión de β -galactosidasas y otras hidrolasas de pared celular (Yuan y col., 2001; Lee y col., 2007).

Dado que habíamos construido plantas transgénicas de *arabidopsis* que sobreexpresaban las β -galactosidasas de garbanzo, la segunda estrategia que intentamos desarrollar consistió en producir estas enzimas en cultivos celulares de células indiferenciadas establecidas a partir de estas plantas transgénicas. Esta técnica combina las ventajas de la producción en cultivos de organismos unicelulares antes mencionadas y además presenta la capacidad de realizar todas las modificaciones postraduccionales típicas de plantas (Hellwig y col., 2004), lo que es muy importante en las enzimas objeto de estudio, puesto que algunas de ellas pueden ser proteínas glicosiladas que no se procesan adecuadamente en *E. coli* ni en *P. pastoris*. Además, la correcta glicosilación favorece la secreción de las proteínas al apoplasto, facilitando así su extracción (Xu y col., 2011).

La menor tasa de crecimiento y el aspecto necrosado de los callos generados a partir de las plantas transgénicas 35S:: β I-Gal y 35S:: β V-Gal (utilizadas para poner a punto el sistema), sugería que la producción de las β I- y β V-Gal en estos callos modificaba la pared celular y comprometía la viabilidad celular. Esto mismo quedaba reflejado en el menor peso fresco de las células en suspensión obtenidas a partir de células 35S:: β I-Gal con las que proseguimos la puesta a punto de esta estrategia. Tras el análisis de los extractos proteicos obtenidos del medio de cultivo, de las suspensiones celulares y de las paredes celulares purificadas de

estas células no fue posible detectar la β I-Gal ni un mayor nivel de actividad β -galactosidásica. Este hecho podría deberse a la acción de las proteasas, cuyos niveles pueden potenciarse de forma muy marcada frente a la producción de proteínas foráneas en cultivos celulares vegetales (Doran, 2006), lo que a su vez podría ser responsable del aumento en la cantidad de proteínas en los extractos obtenidos de las células 35S:: β I-Gal en suspensión y de sus paredes celulares, así como de la ausencia de actividad β -galactosidásica. Por todo ello, esta estrategia se descartó para la producción de β -galactosidasas activas.

Finalmente, la tercera estrategia permitió alcanzar el objetivo buscado. En ella se realizó la expresión transitoria de las ORFs que codifican las 4 β -galactosidasas de garbanzo y las 6 de arabisidopsis en hojas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración. Previamente, nuestro grupo de investigación había intentado la producción de las β -galactosidasas de garbanzo mediante esta estrategia utilizando los vectores pGWB2 y la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*, aunque en ningún caso se consiguieron niveles de expresión detectables (I. Martín, comunicación personal). Así, para abordar esta estrategia de nuevo se utilizaron los vectores de la serie pEAQ-HT (Sainsbury y col., 2009) y la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. Estos vectores presentan una serie de modificaciones que incrementan la producción de las proteínas de interés, como la presencia de las regiones 5'- y 3'-UTR modificadas del RNA-2 del virus del mosaico de *Vigna unguiculata* (CPMV) flanqueando la secuencia del gen que se expresa (Sainsbury y Lomonossoff, 2008) y la inserción en el mismo T-DNA de la secuencia que codifica la proteína P19 del tombusvirus del tomate (TBSV), supresora del silenciamiento inducido por RNA (Sainsbury y col., 2009). Los cambios en la elección del vector y de la cepa de agrobacteria han permitido que esta estrategia sea un éxito y hemos conseguido producir formas activas de β -galactosidasas de garbanzo y arabisidopsis, siendo posible detectar la mayoría de ellas mediante SDS-PAGE.

En general la producción de estas β -galactosidasas es más alta en hojas recogidas 6 d postinfiltración, excepto en el caso de la β IV-Gal de garbanzo (12 d) y de las BGAL3 y BGAL12 que no fueron detectadas mediante electroforesis, indicando su baja producción o la necesidad de optimizar esta estrategia para obtener estas 2 enzimas concretas. El único aspecto que necesita ser analizado en mayor profundidad es el procesamiento al que posiblemente se vea sometida en *N. benthamiana* la proteína β IV-Gal de garbanzo, ya que presenta dos bandas de aproximadamente 70 y 90 KDa en lugar de 78 KDa, peso estimado para esta proteína.

Independientemente de la mayor o menor cantidad de proteína producida en cada caso, lo que queda demostrado es que presentan actividad enzimática frente al sustrato artificial pnp- β -D-galactósido y por lo general el nivel de actividad se correlaciona con la intensidad de la banda correspondiente, salvo en las proteínas BGAL1 y BGAL2 que se detectan de forma clara a los 6 d, aunque la actividad β -galactosidásica es mayor en las hojas recogidas 4 d post infiltración. Por último, tenemos que destacar que las hojas infiltradas con la construcción pEAQ/BGAL1 que produce la proteína BGAL1 de *Arabidopsis* presentaron un aspecto necrosado, más severo a medida que se retrasaba su recogida, lo que podría indicar que las modificaciones mediadas por la BGAL1 en la pared celular de *N. benthamiana* inducen su degradación tal y como ocurre en una infección necrótica, por lo que este efecto debe ser analizado en profundidad.

Así pues, hemos establecido una estrategia rápida y que permite obtener las β -galactosidasas activas en elevada cantidad lo que facilitará el estudio de la actividad de las mismas y la caracterización de su sustrato específico.

Conclusiones

1. La transformación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* con las ORFs de los genes *CarBGal1* y *CarBGal5* de *Cicer arietinum*, que codifican las β -galactosidasas β I-Gal y β V-Gal, causa modificaciones en la composición y estructura de sus paredes celulares, aunque no se detectan alteraciones morfológicas en las plantas transgénicas respecto al WT. Las diferencias entre los efectos inducidos por las proteínas β I-Gal y β V-Gal en la pared de *Arabidopsis* podrían deberse a la propia estructura de ambas β -galactosidasas que condicionaría su actuación sobre diferentes sustratos de la pared celular.

2. La β I-Gal de garbanzo producida en *Arabidopsis* causa una reducción de las cadenas laterales neutras de β -(1,4)-galactano de su pared celular, acompañada por una reducción de las cadenas de α -(1,6)-arabinano, lo que provoca una disminución del contenido de XG y otras hemicelulosas extraídas con álcali. Esto indicaría que son las cadenas laterales de arabinano y galactano las que controlan el grado de interacción de los polisacáridos hemicelulósicos con el resto de componentes de la pared celular.

3. La producción de la β -galactosidasa β V-Gal de garbanzo en *Arabidopsis* causa cambios en el componente péctico de sus paredes celulares, que se reflejan en alteraciones

en los niveles de ramnogalacturonano I, arabinano y homogalacturonano con distinto grado de metilesterificación, cambios que son dependientes del tejido y de la edad de la planta. La ausencia de cambios marcados en los niveles de galactano podría reflejar que su sustrato es otro componente de la pared celular.

4. La regulación transcripcional de los 6 genes *AtBGAL* que codifican las β -galactosidasas de la subfamilia a1 de arabidopsis en respuesta a agentes relacionados con la inducción o inhibición del crecimiento, o con la respuesta a estrés, nos permite confirmar o matizar funciones propuestas previamente para las proteínas BGAL. El fuerte aumento de los transcritos *AtBGAL3* con hormonas inductoras del crecimiento indicaría la participación de BGAL3 en los procesos de expansión y elongación. BGAL4 estaría implicada en el cese del crecimiento y el aumento rigidez de la pared, como se deduce de la fuerte represión de sus transcritos por IAA o su inducción por H_3BO_3 . Finalmente, la fuerte represión de los transcritos *AtBGAL5* y *AtBGAL12* por MeJA, indica la participación de las proteínas correspondientes, entre otros procesos, en la elongación de la raíz.

5. Los distintos miembros de la subfamilia a1 de β -galactosidasas de arabidopsis presentan redundancia funcional, como indican las variaciones de los transcritos *AtBGAL* en los mutantes de pérdida de función *bgal1*, *bgal3* y *bgal5*, en los que no se producen las proteínas BGAL1, BGAL3 y BGAL5, todas ellas localizadas en la pared celular. Esto podría explicar la ausencia de cambios morfológicos y de variaciones drásticas en la capacidad autohidrolítica y en la composición de sus paredes celulares.

6. La pérdida de función de las proteínas BGAL1 y BGAL3 en el doble mutante *bgal1/bgal3* provoca una disminución del crecimiento, reflejada en una menor longitud de los hipocotilos y de los entrenudos apicales del tallo floral, ambos en crecimiento activo. En las paredes celulares de estos órganos se detecta un aumento de las cadenas de galactano que induce un aumento del XG extraído con álcali, confirmando el papel de estas cadenas de galactano en el crecimiento y en la regulación de las interacciones entre las pectinas y las hemicelulosas.

7. Las plantas transgénicas de arabidopsis que sobreproducen las proteínas BGAL1, BGAL3 y BGAL5 presentan una reducción de los niveles de galactano que se localiza en distintos tejidos en función de la β -galactosidasa producida. Esto indicaría una actuación

diferencial de cada una de estas enzimas en función de la estructura característica de la pared en los distintos tipos celulares, lo que a su vez podría depender de variaciones en la especificidad de sustrato.

8. La producción de β -galactosidasas vegetales en hojas de *Nicotiana benthamiana* por expresión transitoria de sus ORFs es el método más eficiente, entre los analizados, para obtener proteínas activas en gran cantidad. Las 4 β -galactosidasas de garbanzo y las 6 β -galactosidasas de la subfamilia a1 de arábidoopsis presentan actividad frente a sustratos artificiales, como el pnp- β -D-galactopiranosido.

Conclusión final: El hecho de disponer de dos sistemas experimentales para modificar las cadenas de galactano de la pared celular en sentidos opuestos, reducirlas en el caso de las plantas que sobreproducen β -galactosidasas, como las plantas 35S:: β I-Gal, y aumentarlas en mutantes de pérdida de función, caso de los mutantes *bgal1/bgal3*, nos permite precisar el posible papel de este polisacárido en la arquitectura de la pared celular. Teniendo en cuenta la correlación entre los niveles de XG extraídos con álcali en los dos tipos de plantas, disminuidos en las plantas 35S:: β I-Gal, y aumentados en el mutante *bgal1/bgal3*, podemos afirmar que el galactano, y en consecuencia las β -galactosidasas, son claves en el control de la organización de los distintos dominios de la pared celular y estarían regulando el grado de interacción no sólo entre las pectinas y el resto de polisacáridos, sino también entre las hemicelulosas y la celulosa, jugando un papel clave en el crecimiento vegetal.

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. (2012). Estudio de la actividad de los promotores de los genes BGAL1 y BGAL3 de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad de Salamanca.
- Albornos, L.; Martín, I.; Pérez, P.; Marcos, R.; Dopico, B.; Labrador, L. (2012). Promoter activities of genes encoding β -galactosidases from *Arabidopsis* a1 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.; Mélida, 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.
- Bao, F.; Shen, J.; Brady, S.R.; Muday, G.K.; Asami, T.; Yang, Z. (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1624-1631.
- Barbier, M.; Thibault, J.-F. (1982). Pectic substances of cherry fruits. *Phytochemistry* 21: 111-115.

- 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.
- Bidhendi, A.; Geitmann, A. (2016).** Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis. *J. Exp. Bot.* 67: 449-461.
- Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1523.
- 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.
- Booten, T. J.; Harris, P. J.; Melton, L. D.; Newman, R. H. (2004).** Solid state ^{13}C -NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains: a new model for xyloglucan-cellulose interactions in the cell wall. *J. Exp. Bot.* 55: 571-583.
- 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.
- Bret-Harte, M.S. (1993).** Total epidermal cell walls of pea stems respond differently to auxin than does the outer epidermal wall alone. *Planta* 190: 379-386.
- 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, D.A.; Harpster, M.H.; Civello P.M.; Palys, J.M.; Bennett, A.B.; Dunsmuir, P. (1999).** Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *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.
- Bush, M.S.; Marry, M.; Huxham, I.M.; Jarvis, M.C.; McCann, M.C. (2001).** Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation. *Planta* 213: 869-880.
- Caffall, K. H.; Mohnen, D. (2009).** The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 344: 1879-1900.
- 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: 233-238.
- 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.
- Chavez Montes, R.A.; Ranocha, P.; Martinez, Y.; Minic, Z.; Jouanin, L.; Marquis, M.; Saulnier, L.; Fulton, L.M.; Cobbett, C.S.; Bitton, F.; Renou, J.P.; Jauneau, A.; Goffner, D. (2008).** Cell wall modifications in *Arabidopsis* plants with altered α -L-arabinofuranosidase activity. *Plant Physiol.* 147: 63-77.
- Chen, J.; Sonobe, K.; Ogawa, N.; Masuda, S.; Nagatani, A.; Yuichi Kobayashi, Y.; Ohta, H. (2013).** Inhibition of *Arabidopsis* hypocotyl elongation by jasmonates is enhanced under red light in phytochrome B dependent manner. *J. Plant Res.* 126: 161-168.
- Chibani, K.; Ali-Rachedi, S.; Job, C.; Job, D.; Jullien, M.; Grappin, P. (2006).** Proteomic Analysis of Seed Dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142: 1493-1510.
- 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.

- Clouse, S.D.; Sasse, J.M. (1998).** Brassinoesteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 427-451.
- Cornuault, V.; Manfield, I.W.; Ralet, M.-C.; Knox, J.P. (2014).** Epitope detection chromatography: a method to dissect the structural heterogeneity and inter-connections of plant cell-wall matrix glycans. *Plant J.* 78: 715-722.
- Cornuault, V.; Buffetto, F.; Rydahl, M.G.; Marcus, S.E.; Torode, T.A.; Xue, J.; Crépeau, M.-J.; Faria-Blanc, N.; Willats, W.G.T.; Dupree, P.; Ralet, M.-C.; Knox, J.P. (2015).** Monoclonal antibodies indicate low-abundance links between heteroxylan and other glycans of plant cell walls. *Planta* 242: 1321-1334.
- Cosgrove, D.J. (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. (2014).** Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Curr. Op. Plant Biol.* 22: 122-131.
- 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.
- Coutinho, P.M.; Henrissat, B. (1999).** Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering" (H.J. Gilbert, G. Davies, H. Henrissat, B. Svensson, eds) pp 3-12. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.
- 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 *Copaifera 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.
- Dick-Pérez, M.; Zhang, Y.; Hayes, J.; Salazar, A.; Zobotina, O.A.; Hong, M. (2011).** Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two-and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry* 50: 989-1000.
- 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.
- Doran, P.M. (2006).** Foreign protein degradation and stability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol.* 24: 426-432.
- 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.
- Durand, C.; Vire-Gibouin, M.; Follet-Gueye, M.L.; Duponchel, L.; Moreau, M.; Ierouge, P.; Driouich, A. (2009).** The organization pattern of root border-like cells of Arabidopsis is dependent on cell wall homogalacturonan. *Plant Physiol.* 150: 1411-1421.
- 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. (2001).** Caracterización y expresión génica diferencial de β -galactosidasas de *Cicer arietinum* L. en relación con el crecimiento vegetal. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- 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.
- Francis, K.E.; Lam, S.Y.; Copenhaver, G.P. (2006).** Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylsterase gene. *Plant Physiol.* 142: 1004-1013.
- Franková, L.; Fry, S.C. (2013).** Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell-wall polysaccharides. *J. Exp. Bot.* 64: 3519-3550.
- 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 a1 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.
- Gendreau, E.; Traas, J.; Demos', T.; Crandjean, O.; Michel, M.; Hofte, H. (1997).** Cellular Basis of Hypocotyl Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 11: 295-305.
- 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. Relationship to pectin properties. En "Plant Cell Wall Polymers. Biogenesis and Biodegradation" (N.G. Lewis, M.G. Paice, eds), vol. 399, pp. 312-323. ACS Symposium Series. Washington DC. USA.
- Gorshkova, T.A.; Wyatt, S.E.; Salnikov, V.V.; Gibeaut, D.M.; Ibragimov, M.R.; Lozovaya, V.V.; Carpita, N.C. (1996).** Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. *Plant Physiol.* 110: 721-729.
- Gorshkova, T.; Ageeva, M.; Chemikosova, S.; Salnikov, V. (2005).** Tissue-specific processes during cell wall formation in flax fiber. *Plant. Biosys.* 139: 88-92.
- Gorshkova, T.; Mokshina, N.; Chernova, T.; Ibragimova, N.; Salnikov, V.; Mikshina, P.; Tryfona, T.; Banasiak, A.; Immerzeel, P.; Dupree, P.; Mellerowicz, E.J. (2015).** Aspen tension wood fibers contain β -(1,4)-galactans and acidic arabinogalactans retained by cellulose microfibrils in gelatinous walls. *Plant Physiol.* 169: 2048-2063.
- 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.
- Gu, J.; Catchmark, J. (2013).** The impact of cellulose structure on binding interactions with hemicellulose and pectin. *Cellulose* 20: 1613-1627.
- 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.; Apperley, D.C.; Evans, B.W.; Huxham, I.M.; Jardine, W.G., Viëtor, R.J.; Reis, D.; Vian, C.; Jarvis, M.C. (1998). Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. *Plant J.* 16: 183-190.

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.

Hanford, M.G.; Baldwin, T.C.; Goubet, F.; Prime, T.A.; Miles, J.; Yu, X.; Dupree, P. (2003). Localisation and characterisation of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 218: 27-36.

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.

Hao, Z.Y.; Mohnen, D. (2014). A review of xylan and lignin biosynthesis: foundation for studying *Arabidopsis* irregular xylem mutants with pleiotropic phenotypes. *Crit Rev Biochem Mol* 49: 212-241.

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.* 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. Oxford. U.K.

Hayashi, T.; Kaida, R. (2011). Functions of xyloglucan in plant cells. *Mol. Plant* 4: 17-24.

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* Wilzsch). *Carbohydr. Res.* 166: 31-42.

Higgins, D.R.; Cregg, J.M. (1998). Introduction to *Pichia pastoris*. En "Pichia Protocols" (D.R. Higgins, J.M. Cregg, eds) pp. 1-15. Humana Press. New York. USA:

- Hijazi, M.; Roujol, D.; Nguyen-Kim, H.; Castillo, L.dR.C.; Saland, E.; Jamet, E.; Albenne, C. (2014).** Arabinogalactan protein 31 (AGP31), a putative network-forming protein in *Arabidopsis thaliana* cell walls? *Ann. Bot.* 114: 1087-1097.
- 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.
- Hongo, S.; Sato, K.; Yokoyama, R.; Nishitani, K. (2012).** Demethylesterification of the primary wall by PECTIN METHYLESTERASE35 provides mechanical support to the *Arabidopsis* stem. *Plant Cell* 24: 2624-2634.
- 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.
- Immerzeel, P.; Eppink, M.M.; de Vries, S.C.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. (2006).** Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiol Plant* 128: 18-28.
- 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.
- Ishii, T.; Matsunaga, T.; Pellerin, P.; O'Neill, M.A.; Darvill, A.; Albersheim, P. (1999).** The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J. Biol. Chem.* 274: 13098-13104.
- 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.
- Izquierdo, L. (2015).** Análisis funcional de dos β -galactosidasas de *Cicer arietinum* (β III-Gal y β IV-Gal) y tres β -galactosidasas de la subfamilia a1 de *Arabidopsis thaliana* (AtBGAL2, AtBGAL4 y AtBGAL12). Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- 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.
- Jiang, L.; Yang, S.L.; Xie, L.F.; Pua, C.S.; Zhang, X.Q.; Yang, W.C.; Sundaresan, C.; Ye, D. (2005).** VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract. *Plant Cell* 17: 585-596
- Jiménez, T.; Martín, I.; Labrador, E.; Dopico, B. (2006).** The immunolocalization 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.
- Kacuráková, M.; Wilson, R.H. (2001).** Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydr. Polym.* 44: 291-303.
- 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.
- Karimi, M.; Depicker, A.; Hilson, P. (2007).** Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiol.* 145: 1144-1154.
- 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.
- Keller, C.P.; Stahlberg, R.; Barkawi, L.S.; Cohen, J.D. (2004).** Long-Term Inhibition by auxin of leaf blade expansion in bean and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1217-1226.
- 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.
- Knox, J.P.; Linstead, P.J.; King, J.; Cooper, C.; Roberts, K. (1990).** Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181: 512-521.
- Koizumi, K.; Ryusuke, A.; Yokoyama, A.; Nishitani, K. (2009).** Mechanical load induces upregulation of transcripts for a set of genes implicated in secondary wall formation in the supporting tissue of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res* 122: 651-659.
- 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.
- Kubo, M.; Udagawa, M.; Nishikubo, N.; Horiguchi, G.; Yamaguchi, M.; Ito, J.; Mimura, T.; Fukuda, H.; Demura, T. (2005).** Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19: 1855-60.
- 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 nojirimycin. *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.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lampert, D.T.A. (1965).** The protein component of the primary cell walls. *Adv. Bot. Res.* 2: 151-218.
- Lampert, D.T.A. (1970).** Cell wall metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21: 235-270.

- Lamport, D.T.; Kieliszewski, M.J.; Chen, Y.; Cannon, M.C. (2011).** Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiol.* 156: 11-19.
- Lapasin, R.; Pricl, S. (1995).** The rheology of industrial polysaccharides. Theory and applications. Blackie, London. U.K. pp 279-281
- Larskaya, A.; Gorshkova, T.A. (2015).** Plant Oligosaccharides. Outsiders among Elicitors? *Biochem.* 80: 881-900.
- 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.
- Lazo, G.R.; Stein, P.A.; Ludwig, R. A. (1991).** A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *agrobacterium*. *Nat. Biotechnol.* 9: 963-967.
- Le Gall, H.; Philippe, P.; Domon, J-M.; Gillet, F.; Pelloux, J.; Rayon, C. (2015).** Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* 4: 112-166.
- 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.
- Lewis, D.R.; Wu, G.; Ljung, K.; Edgar, P. (2009).** Spalding1 Auxin transport into cotyledons and cotyledon growth depend similarly on the ABCB19 Multidrug Resistance-like transporter. *Plant J.* 60: 91-101.
- 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.
- Lin, D.; Lopez-Sanchez, P.; Gidley, M.J. (2015).** Binding of arabinan or galactan during cellulose synthesis is extensive and reversible. *Carbohydr. Polym.* 126: 108-121.
- 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: GALS1 in *Arabidopsis thaliana* is a β -1,4-galactan β -1,4-galactosyltransferase. *Plant Cell* 24: 5024-5036.
- Ljung, K.; Bhalerao, R.P.; Sandberg, G. (2001).** Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28: 465-474.
- 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.; Leautic, 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 siliqua development in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem.* 72: 59-67.

Lovatt, C.J. (1985). Evolution of xylem resulted in a requirement for boron in the apical meristems of vascular plants. *New Phytol.* 99: 509-522.

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.; Verherbruggen, 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.

Susan E. Marcus, S.E.; Blake, A. T.; Benians, T.A.S.; Kieran J. D. Lee, K.J.D.; Poyser, C.; Donaldson, L.; Leroux, O.; Rogowski, A.; Petersen, H.L.; Boraston, A.; Gilbert, H.J.; William G. T. Willats, W.G.T.; Knox, J.P. (2010). Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. *Plant J.* 64: 191-203.

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 during 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.

Mattsson, J.; Ckurshumova, W.; Berleth, T. (2003). Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol* 131: 1327-1339.

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.
- McKenna, S.T.; Kundel, J.G.; Bosch, M.; Rounds, C.M.; Vidali, L.; Winship, L.J.; Hepler, P.K. (2009).** Exocytosis precedes and predicts the increase in growth in oscillating pollen tubes. *Plant Cell* 21: 3026-3040.
- 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.
- Monshausen, G.B.; Gilroy, S. (2009).** Felling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol.* 19: 228-235.
- Montero, E.; Alonso, J.; Canada, F.J.; Fernandez-Mayoralas, A.; Martin-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.
- Moore, J.P.; Farrant, J.M.; Driouich, A. (2008).** A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *Plant Signal. Behav.* 3: 102-104.
- 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.
- Morvan, C.; Andeme-Onzighi, C.; Girault, R.; Himmelsbach, D.S.; Driouich, A.; Akin, D.E. (2003).** Building flax fibres: more than one brick in the walls. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 935-944.
- 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 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.

Novy, R.; Drott, D.; Yaeger, K.; Mierenhof, R. (2001). Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations* 12: 1-3.

Obro, J.; Borkhardt, B.; Harholt, J.; Skjøt, 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.

Oosterveld, A.; Beldman, G.; Voragen, A.G. (2000). Oxidative cross-linking of pectic polysaccharides from sugar beet pulp. *Carbohydr. Res.* 328: 199-207.

Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.* 5: 86

- 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.
- Park, Y.B.; Cosgrove, D.J. (2012).** A revised architecture of primary cell walls based on biochemical changes induced by substrate-specific endoglucanases. *Plant Physiol.* 158: 1933-1943.
- Park, Y.B.; Cosgrove, D.J. (2015).** Xyloglucan and its interactions with other components of the growing cell wall. *Plant Cell Physiol.* 56: 180-94.
- 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.
- Peaucelle, A.; Braybrook, S.A.; Le Guillou, L.; Bron, E.; Kuhlemeier, C.; Höfte, H. (2011).** Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 21: 1720-1726.
- Henriette L. Pedersen, H.L.; Fangel, J.U.; McCleary, B.; Ruzanski, C.; Rydahl, M.G.; Ralet, M.-C.; Farkas, V.; von Schantz, L.; Marcus, S.E.; Andersen, M.C.F.; Field, R.; Ohlin, M.; Knox, J.P.; Clausen, M. H.; Willats, W.G.T. (2012).** Versatile High Resolution Oligosaccharide Microarrays for Plant Glycobiology and Cell Wall Research. *J. Biol. Chem.* 287: 39429-39438.
- 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.
- Pereira, C.S.; Ribeiro, J.M.; Vatulescu, A.D.; Findlay, K.; Macdougall, A.J.; Jackson, P.A. (2011).** Extensin network formation in *Vitis vinifera* callus cells as an essential and causal event in rapid and H₂O₂-induced reduction in primary cell wall hydration. *BMC Plant Biol.* 11: 106.
- 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.
- Peyret, H.; Lomonosoff, G.P. (2013).** The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* 83: 51-58.

- Phan, T.D.; Bo, W.; West, G.; Lycett, G.W.; Tucker, G.A. (2007).** Silencing of the major salt-dependent isoform of pectinesterase in tomato alters fruit softening. *Plant Physiol.* 144: 1960-1967.
- Pieterse, C.M.; Leon-Reyes, A.; Van der Ent, S.; Van Wees, SC. (2009).** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5: 308-316.
- Popper, Z.A.; Fry, S.C. (2008).** Xyloglucan-pectin linkages are formed intra-protoplasmically, contribute to wall assembly, and remain stable in the cell wall. *Planta*, 227: 781–794.
- 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" (A.W. Robards, ed) pp. 256-309, McGraw-Hill, Londres. U.K.
- Prieto, G; Venco, L.; Simón, F.; Genchi, C. (1997).** Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: detection of specific IgG for the diagnosis of occult infection. *Vet. Parasitol.* 70: 209-217.
- 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.
- Ralet, M-C.; Tranquet, O.; Poulain, D.; Moïse, A.; Guillon, F. (2010).** Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. *Planta* 231: 1373-1383.
- Ratnaparkhe, S.; Venkatachalam, S.; Hahn, M.G.; Pattathil, S. (2013).** Analyses using cell wall glycan-directed monoclonal antibodies reveal xylan-degradation by two microbial glycosyl hydrolases in cell walls from poplar and switchgrass biomass. *J. Bioremed. Biodeg.* 54: 004.
- Rao, M.V.; Lee, H.; Davis, K.R. (2002).** Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *Plant J.* 32: 447-456.
- 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: 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.
- Roach, M.J.; Mokshina, N. Y.; Badhan, A.; Snegivera, A.V.; Hobson, N.; Deyholos, M. K.; Gorshkova, T. A. (2011).** Development of cellulosic secondary walls in flax fibers requires β -galactosidase. *Plant Physiol.* 156: 1351-1363.
- 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.
- Rojo, E.; Leon, J.; Sanchez-Serrano, J.J. (1999).** Cross-talk between wound signaling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 20: 135-142.
- 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 Ca^{2+} 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.
- Sasek, V.; Novakova, M.; Jindrichova, B.; Boka, K.; Valentova, O.; Burketova, L. (2012).** Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic Ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signalling in *Brassica napus*. *Mol. Plant Microbe In.* 25: 1238-1250.
- Satiat-Jeunemaitre, B.; Darzens, D. (1986).** *In vivo* hemicelluloses-cellulose equilibrium modifications: effects on helicoidal cell wall assembly. En "Cell Walls 86", pp. 68-69. Paris.
- Scarpella, E.; Barkoulas, M.; Tsiantis, M. (2010).** Control of leaf and vein development by auxin. *Perspect. Biol.* 2: a001511.
- 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.* 58: 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).** Arabinogalactanproteins in the multiple domains of the plant surface. *Adv. Bot. Res.* 30: 207-289.
- 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.
- Shols, H.A.; Baks, E.J.; Shipper, D.; Voragen, A.G.J. (1995).** A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydr. Res.* 279: 265-279.
- Schröder, F.; Lisso, J.; Obata, T.; Erban, A.; Maximova, E.; Giavalisco, P.; Kopka, J.; Fernie, A.R.; Willmitzer, L.; Müssig, C. (2014).** Consequences of induced brassinosteroid deficiency in *Arabidopsis* leaves. *Plant Biol.* 14: 309
- Showalter, A.M. (1993).** Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9-23.
- Sieburth, L.E. (1999).** Auxin is required for leaf vein pattern in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 121: 1179-1190.
- Simos, G.; Giannakouros, T.; Georgatsos, 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, B.; Avci, U.; Inwood, S.; Grimson, M. J.; Landgraf, J.; Mohnen, D.; Sørensen, I.; Wilkerson, C.; Willats, W. G.T.; Haigler C.H. (2009).** A specialized outer layer of the primary cell wall joins elongating cotton fibers into tissue-like Bundles. *Plant Physiol.* 150: 684-699.
- 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.* 5705: 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.
- Staswick, P.E.; Wenpei, S.U.; Howell, S.H. (1992).** Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 6837-6840.

- Stepanova, A.N.; Robertson-Hoyt, J.; Yun, J.; Benavente, LM.; Xie, DY.; Dolezal, K.; Schlereth, A.; Jurgens, G.; Alonso, JM. (2008).** TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133: 177-191.
- 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.
- Stevens, B.J.H.; Selvendran, R.R. (1984).** Structural features of cell-wall polysaccharides of the carrot *Daucus carota*. *Carbohydr. Res.* 128: 321-333
- Stevenson, T.T.; Darvill, A.G.; Albersheim, P. (1988).** Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* 182: 207-226.
- Stoyanova-Bakalova, E.; Karanov, E.; Petrov, P.; Hall, M.A. (2004).** Cell division and cell expansion in cotyledons of *Arabidopsis* seedlings. *New Phytol.* 162: 471-479.
- Strasser, G.R.; Amadò, 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.
- Surgun, Y.; Bürün, B. (2015).** Analysis of Effects of 24-Epibrassinolide and Boron Treatments on the Expression of *CycD3;1*, *TCH4* and *KOR* Genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Seedlings using Semi-Quantitative RT-PCR. *J. Appl. Biol. Sci.* 9: 59-65.
- Sweeney, M.D.; Xu, F. (2012).** Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: Recent Dev.. *Catal.* 2: 244-263.
- Swanson, S.; Gilroy, S. (2010).** ROS in plant development. *Physiol. Plant.* 138: 384-392.
- Szymanska-Chargot, M.; Zdunek, A. (2013).** Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food Biophys.* 8: 29-42.
- Takeda, T.; Furuta, Y.; Awano, T.; Mizuno, K.; Mitsuishi, Y.; Hayashi, T. (2002).** Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 9055-9060.
- Takeuchi, M.; Matshushima, H.; Yugawara, Y. (1980).** Long-term freeze-preservation of protoplast of carrot and *Marchantia* *CryoLetters* 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.
- Talboys, P.J.; Zhang, H.M.; Knox, J.P. (2011).** ABA signalling modulates the detection of the LM6 arabinan cell wall epitope at the surface of *Arabidopsis thaliana* seedling root apices. *New Phytol.* 190: 618-626.
- Tan, L.; Eberhard, S.; Pattathil, S. (2013).** An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *Plant Cell* 25: 270-287.
- Tanaka, K.; Nakamura, Y.; Asami, T.; Yoshida, S.; Matsuo, T.; Okamoto, S. (2003).** Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*: brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. *J Plant Growth Regul.* 22: 259-271.
- 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.
- Tenhaken, R. (2014).** Cell wall remodeling under abiotic stress. *Plant Sci.* 5: 771.
- 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.
- Thompson, D.S. (2008).** Space and time in the plant cell wall: relationships between cell type, cell wall rheology and cell function. *Ann. Bot.* 101: 203-11.
- Tiné, M.A.S.; Cortelazzo, A.L.; Buckeridge, M.S. (2000).** Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *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.
- Underwood, W. (2012).** The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Plant Sci.* 3: 85.
- 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.
- Vanstraelen, M.; Benková, E. (2012).** Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 463-487.
- 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.
- Verherbruggen, Y.; Marcus, S.E.; Haeger, A.; Ordaz-Ortiz, J.J.; Knox, J.P. (2009).** An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydr. Res.* 344: 1858-1862.
- 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.
- Vorwerk, S.; Somerville, S.; Somerville, C. (2004).** The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 9: 203-209
- 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.
- Walker, M.; Tehseen, M.; Doblin, M.S.; Pettolino, F.A., Wilson, S.M.; Bacic, A.; Golz, J.F. (2011).** The transcriptional regulator LEUNIG_HOMOLOG regulates mucilage release from the Arabidopsistesta. *Plant Physiol.* 156: 46-60.
- 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.
- Wang, T.; Park, Y.B.; Caporini, M.A.; Rosay, M.; Zhong, L.; Cosgrove, D.J.; Hong, M. (2013b).** Sensitivity-enhanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls. *Proc. Natl.Acad. Sci USA.* 110: 16444-16449.
- Wang, T.; Hong, M. (2016).** Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls *J. Exp. Bot.* 67: 503-514.
- 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.

Werner, T.; Motyka, V.; Laucou, V.; Smets, R.; Van Onckelen, H.; Schmölling, T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.

Western, T.L.; Burn, J.; Tan, W.L.; Skinner, D.J.; Martin-McCaffrey, L.; Moffatt, B.A; Haughn, G.W. (2001). Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 998-1011.

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.

Wolf, S.; Mouille, G.; Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol. Plant* 2: 851-860.

Wolf, S.; Greiner, S. (2012). Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma* 249: S169-S175.

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

Yamaguchi, H.; Miyazaki, M. (2014). Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules* 4: 235.

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 β -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.

Yapo, B.M. (2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins. A new hypothetical model. *Carbohydr Polym.* 86: 373-385.

Yennawar, N.H.; Li, L-C.; Dudzinski, D.M; Tabuchi, A.; Cosgrove, D. (2006). Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 14664-14671.

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.

Yuan, S.; Wu, Y.; Cosgrove, D. (2001). A Fungal Endoglucanase with Plant Cell Wall Extension Activity. *Plant Physiol.* 127: 324-333.

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 homogalacturonans and enzymes degrading them during cotton cotyledon expansion. *Phytochem.* 68: 1094-1103.

Zhang, H.; Kim, M.; Krishnamachari, V.; Payton, P.; Sun, Y.; Grimson, M.; Farag, M.A.; Ryu, C-M.; Allen, R.; Melo, I.S.; Paré, P.W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226: 839-851.

Zhou, J.; Wang, Y-H.; Chu, J.; Luo, L-Z.; Zhuang, Y-P.; Zhang, S-L. (2009). Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresource Technol.* 100: 819-825.

Zhiponova, M.K.; Vanhoutte, I.; Boudolf, V.; Betti, C.; Dhondt, S.; Coppens, F.; Mylle, E.; Maes, S.; González-García, M.P.; Caño-Delgado, A.I.; Inzé, D.; Beemster, G.T.; De Veylder, L.; Russinova E. (2013). Brassinosteroid production and signaling differentially control cell division and expansion in the leaf. *New Phytol.* 197: 490-502.

Zykwinska, A.; Ralet, M.-C.; Garnier, C.; Thibault, J.-F. (2005). Evidence for in vitro binding of pectic side chains to cellulose. *Plant Physiol.* 139: 397-407.

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.

Zykwinska, A.; Thibault, J-F.; Ralet, M-C. (2008a). Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose. *Carbohydr. Polym.* 74: 957-961.

Zykwinska, A.; Thibault, J-F.; Ralet, M-C. (2008b). Modelling of xyloglucan, pectins and pectic side chains binding onto cellulose microfibrils. *Carbohydr. Polym.* 74: 23-30.