



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Biología experimental

**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PARED CELULAR DUF642 EN EL
DESARROLLO DE LAS ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS EN *ARABIDOPSIS***

THALIANA L.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ ERIK CRUZ VALDERRAMA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

CD. MX. JUNIO DEL 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Biología experimental

**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PARED CELULAR DUF642 EN EL
DESARROLLO DE LAS ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS EN *ARABIDOPSIS***

THALIANA L.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ ERIK CRUZ VALDERRAMA

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

MÉXICO, CD. MX. JUNIO DEL 2018




Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 22 de enero de 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, al alumno **CRUZ VALDERRAMA JOSÉ ERIK** con número de cuenta **303051141**, con la tesis titulada: "**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE PARED CELULAR DUF642 EN EL DESARROLLO DE LAS ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS EN *Arabidopsis thaliana* L**", bajo la dirección de la **DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN**:

Presidente: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
Vocal: DR. ULISES YUNUÉN ROSAS LÓPEZ
Secretario: DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
Suplente: DRA. MA. DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ
Suplente DRA. ROSANA SÁNCHEZ LÓPEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a, 20 de marzo de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por mi formación académica.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de doctorado N° 255175, al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo con los proyectos IN 207915 y IN 203218.

A mi tutora: Dra. Alicia Gamboa de Buen y a los miembros de mi comité tutorial: Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán y Dr. Eleazar Martínez Barajas.

Este trabajo fue realizado principalmente en el Laboratorio de Ecología Fisiológica del Instituto de Ecología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Alicia Gamboa de Buen. A ella, a los que están y a los que ya se fueron, mi gratitud toda la vida.

Dedico este trabajo a Dios, a mi familia, a mis amigos, a todas las personas que directa o indirectamente me han ayudado a concluir la tesis y a aquellos a los que les pueda servir.

Agradezco a todo el equipo perteneciente al Laboratorio del Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM, especialmente a la M en C. Mónica Karina Pérez Pacheco por todo su apoyo técnico y académico en las técnicas necesarias para la tesis. A la Dra. Clara Esquivel Huesca por su invaluable ayuda y experiencia para el aprendizaje de la ultramicrotomía para resinas plásticas.

A la Dra. Karina Jiménez Durán en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), por toda su colaboración para obtener resultados determinantes en esta tesis.

-- How far did you go in school?

-- I went all the way.

Guión de "Pretty Woman" por Jonathan Frederick Lawton

Índice

Lista de abreviaturas	3
Lista de figuras	5
Resumen	7
Abstract	8
Introducción general	9
1. <i>Arabidopsis</i> como una planta modelo experimental	9
2. El desarrollo de las estructuras reproductivas en <i>Arabidopsis</i>	10
3. La fecundación en <i>Arabidopsis</i>	15
4. La semilla de <i>Arabidopsis</i>	15
4.1 El desarrollo del embrión en <i>Arabidopsis</i>	16
4.2. El desarrollo del endospermo en <i>Arabidopsis</i>	17
5. La pared celular vegetal primaria	19
Antecedentes del proyecto	21
6.1 Las pectinas	21
6.2 Proteínas de la familia DUF642	24
Hipótesis general	26
Objetivo general	26
• Objetivos particulares	26
Materiales y métodos	26
• Material biológico	26
• Germinación y sobrevivencia de las plántulas	27

• Ensayos de elongación del tubo polínico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	28
• Nutrición	28
• Plantas transgénicas	29
• Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tiempo real	29
• Pruebas de inmunohistoquímica	30
• Microscopía confocal	31
Resultados y organización de la tesis	32
Capítulo 1. Participación de BDX en el desarrollo de las estructuras reproductivas de <i>Arabidopsis</i>	32
Capítulo 2. Alteración de las semillas de <i>bdx-1</i> relacionada a la modificación en la arquitectura de la pared celular del endospermo y asociada a la desmetil esterificación de las pectinas	42
Capítulo 3. Resultados adicionales. Participación de BDX en el crecimiento del hipocótilo a través de la desmetil esterificación de las pectinas y su relación con la distribución y concentraciones activas de las auxinas	56
Discusión general	70
Conclusiones y consideraciones finales	75
Bibliografía	76
Anexos	82

Lista de abreviaturas

MES	4-Morpholineethanesulfonic acid
ABA	Absciscic Acid (Ácido abscísico)
GalU	Ácido D-galacturónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	<i>AGAMOUS</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
<i>AIN</i>	<i>AINTEGUMENTA</i>
<i>AP1</i>	<i>APETALA1</i>
<i>AP2</i>	<i>APETALA2</i>
<i>AP3</i>	<i>APETALA3</i>
<i>BDX</i>	<i>BIIDXI</i>
Col.	Ecotipo Columbia
CAL	CAULIFLOWER
CaCl ₂	Cloruro de calcio
KCl	Cloruro de potasio
DUF642	Domain unknown function 642 (Dominio de unión desconocido 642)
<i>DGR2</i>	<i>DUF642-L-GalL-responsive gene 2</i>
EDE1	ENDOSPERM DEFECTIVE1
FIS-PRC2	FERTILIZACION INDEPENDENT SEED POLYCOMB COMPLEX2
FM	Floral meristem (Meristemo floral)
FT	Flowering Locus T
GFP	Green fluorescent protein (Proteína verde fluorescente)
HG	Homogalacturonano
IM	Inflorescence meristem (Meristemo de inflorescencia)

Ca ²⁺	Ion calcio
LFY	LEAFY
ORF's	Open Reading Frames (Marcos de lectura abiertos)
MS	Medio Murashige & Skoog
Mpb	Mega pares de bases
µm	Micrómetro
µM	Micro molar
mg	Mili gramos
mm	Milímetro
mM	Mili molar
MSI1	MULTICOPY SUPPRESOR OF IRA1
nm	Nanómetro
PBS	Phosphate-buffered saline solution (Solución salina amortiguada con fosfatos)
PCR	Polimerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PIN	PIN-formed proteins
<i>PI</i>	<i>PISTILLATA</i>
PGIP	Polygalacturonase protein inhibitor (Inhibidor de poligalacturonasa)
PG	Poligalacturonasa
PMEI	Pectin methyl esterase inhibitor (Inhibidor de pectin metil esterasa)
PME	Pectin methyl esterase (Pectin metil esterasa)
SAM	Shoot apical meristem (Meristemo apical del brote)
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
<i>TEB</i>	<i>TEEBE</i>
WT	Wild type (Tipo silvestre)
<i>WUS</i>	<i>WUSCHEL</i>
ZOU	ZHOUPI

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia en condiciones controladas.

Figura 2. Flor de *Arabidopsis thaliana*.

Figura 3. Esquema general del desarrollo embrionario.

Figura 4. Esquema y corte longitudinal de la semilla durante el proceso de celularización del endospermo.

Figura 5. Desmetilesterificación de las pectinas y sus posibles consecuencias en la estructura de la pared celular primaria.

Figura 6. Mediciones de longitud y diámetro de las semillas de *Arabidopsis*.

Figura 7. Fenotipo de las líneas de menor expresión de *BDX*.

Figura 8. Estadios del desarrollo de la flor en *A. thaliana*.

Figura 9. Estudios histológicos realizados en distintos estadios del desarrollo de la flor en *Arabidopsis*.

Figura 10. Cortes donde se muestra a los granos de polen en distintas fases del desarrollo de la flor.

Figura 11. Viabilidad de los granos de polen en las líneas de menor expresión de *BDX*.

Figura 12. Cortes que muestran el desarrollo del óvulo en distintas fases del desarrollo de la flor.

Figura 13. Cortes que muestran el desarrollo del óvulo en la fase final de la megagametogénesis.

Figura 14. Raíces de plantas con el marcador DR5-GFP siete días posteriores a la siembra.

Figura 15. Marcador DR5-GFP en las anteras de tres distintas fases del desarrollo de la flor de *Arabidopsis*.

Figura 16. Ensayos preliminares de expresión de los genes marcadores de inanición *ATL8* y *KMD4* en inflorescencias y hojas de roseta de plantas de la línea *bdx-1* y WT.

Figura 17. Número de tallos generados desde la roseta de las plantas de *Arabidopsis*.

Figura 18. Presencia de auxinas activas en etapa de torpedo temprano del embrión en *Arabidopsis*.

Figura 19. Concentración y distribución de auxinas en silicuas, semillas y embriones de la mutante *bdx-1*.

Figura 20. Esquema que ejemplifica la regulación que podrían ejercer las proteínas DUF642 y en específico BDX en el grado de desmetil esterificación de las pectinas y la distribución y/o acumulación de auxinas.

Resumen

En *Arabidopsis thaliana*, la producción de flores y frutos implica el desarrollo sincrónico de los estambres y el pistilo para una fecundación exitosa y finalmente, producción de semillas viables. Anteriormente se ha descrito que la proteína DUF642, codificada por el gen *BIIDX1*, *BDX* (*At4g32460*) está involucrada en la reproducción de la planta *Arabidopsis*. *BIIDX1* es una proteína de la pared celular involucrada en la producción de semillas y la regulación de la actividad de pectin metil esterases (PME's). En este estudio, las líneas de plantas previamente descritas de menor expresión de *BDX*: (*bdx-1* y *ASBDX*), que producen pocas semillas, se caracterizaron mediante estudios morfológicos e inmunohistológicos. Los embriones de las semillas amorfas *bdx-1* tienen un tamaño variable, embriones anormalmente curvados y tienen menos pectinas desmetil esterificadas en las zonas del endospermo, donde el embrión ejerce presión física para desarrollarse. Las anteras de plantas *bdx-1* producen algunos granos de polen colapsados y su porcentaje de germinación es menor tanto en las plantas *bdx-1* como en las *ASBDX* con respecto a las líneas silvestres (WT). Esta disminución de la función del polen en las plantas *bdx-1* y *ASBDX* explica en parte la reducción de la producción de semillas. Además, la acumulación de auxinas activas disminuye visiblemente en la parte final del desarrollo de las anteras de la línea *bdx-1* con respecto a las WT.

Adicionalmente, en un modelo sencillo para explicar la relación del grado de desmetil esterificación de las pectinas con el flujo de auxinas, se muestra que los hipocótilos de *bdx-1* son más largos en condiciones de temperatura normales, tienen más auxinas activas detectables en la epidermis y aparentemente, menor grado de desmetil esterificación en las paredes celulares y además, el transportador de eflujo de las auxinas PIN1, muestra una localización anormal en la línea *bdx-1* con respecto a la WT, siendo una posible causa de la deslocalización de las auxinas.

Nuestros resultados muestran que la proteína *BIIDX1* está involucrada en el plegamiento del embrión por medio de la desmetil esterificación de las pectinas de las paredes celulares, en zonas particulares del endospermo. En la fertilidad masculina, posiblemente está relacionada con la acumulación de auxinas durante el desarrollo tardío de las anteras y con la elongación del hipocótilo, regulando el crecimiento celular por medio de la actividad de desmetil esterificación de las pectinas, que a su vez se relaciona con la distribución y/o acumulación de las auxinas.

Abstract

In *Arabidopsis thaliana*, the production of flowers and fruits implies the synchronous development of the stamens and the pistil for a successful fertilization and finally, the production of viable seeds. It has previously been described that the DUF642 protein, encoded by the *BIIDX1* gene, *BDX* (*At4g32460*) is involved in the reproduction of the *Arabidopsis* plant. BIIDX1 is a cell wall protein involved in the production of seeds and the regulation of the activity of pectin methyl esterases (PME's). In this study, the plant lines previously described with lower expression of *BDX*: (*bdx-1* and ASBDX), which produce few seeds, were characterized by morphological and immunohistological studies. The embryos of *bdx-1* amorphous seeds have a variable size, abnormally curved embryos and have less demethyl esterified pectins in the areas of the endosperm, where the embryo exerts physical pressure to develop. The anthers of *bdx-1* plants produce some collapsed pollen grains and their percentage of germination is lower in both the *bdx-1* and the ASBDX plants with respect to the wild-type lines (WT). This decrease in pollen function in *bdx-1* and ASBDX plants partly explains the reduction at seed production. In addition, the accumulation of active auxins visibly decreases in the final development of anthers in the *bdx-1* line with respect to the WT.

Additionally, in a simpler model to explain the ratio of the degree of demethyl esterification of the pectins with the flow of auxins, it is shown that the hypocotyls of *bdx-1* are longer under normal temperature conditions, have more active auxins detectable in the epidermis and apparently, less degree of demethyl esterification in the cell walls and in addition, the efflux transporter of the auxins PIN1, shows an abnormal location in the line *bdx-1* with respect to the WT, being a possible cause of the relocation of auxins.

Our results show that the BIIDX1 protein is involved in the embryo bending by means of the demethyl esterification of the pectins in the cell walls at particular areas of the endosperm; in male fertility, is possibly related to the accumulation of auxins during the late development of the anthers and with the hypocotyl elongation, in regulating cell growth through the demethyl esterification activity of the pectins, which in turn is related to the distribution and/or accumulation of auxins.

Introducción general

1. *Arabidopsis* como una planta modelo experimental

El uso de modelos experimentales en la historia de la investigación científica ha permitido comprender varios mecanismos generales que regulan procesos biológicos, a partir del estudio del comportamiento individual de ciertas especies (Kellogg y Shaffer, 1993).

Dentro de los modelos experimentales en las plantas, se eligió a *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) como uno de los más representativos. *Arabidopsis* es una hierba anual de la familia Brassicaceae que se desarrolla en climas templados a fríos y está ampliamente distribuida en Europa, Norteamérica, Asia y el norte de África. Se relaciona con varias plantas de interés humano, como la mostaza, la canola y distintos tipos de coles (Pigliucci, 1998). Desde la década de 1950's comenzó a utilizarse como modelo a nivel genético, por la facilidad para generar mutaciones y seguir temporalmente a las siguientes generaciones. En la actualidad, *Arabidopsis* es utilizada en investigaciones sobre fisiología, biología molecular, celular y del desarrollo de las plantas.

Las plantas de *Arabidopsis* presentan un tamaño adecuado para su crecimiento en cámaras con condiciones ambientales controladas y su ciclo de vida es corto, aproximadamente de dos meses para el ecotipo Columbia (Fig. 1). Asimismo, es un organismo diploide, con un genoma pequeño en comparación a otras plantas (135 Mpb) (Bennett *et al.*, 2003), un número reducido de cromosomas (5) y aproximadamente 27000 genes que codifican para proteínas (Swarbreck *et al.*, 2008). Todas estas características hacen de *Arabidopsis* una especie modelo adecuada para muchas investigaciones que se realizan en las plantas (Mitchell-Olds, 2001).

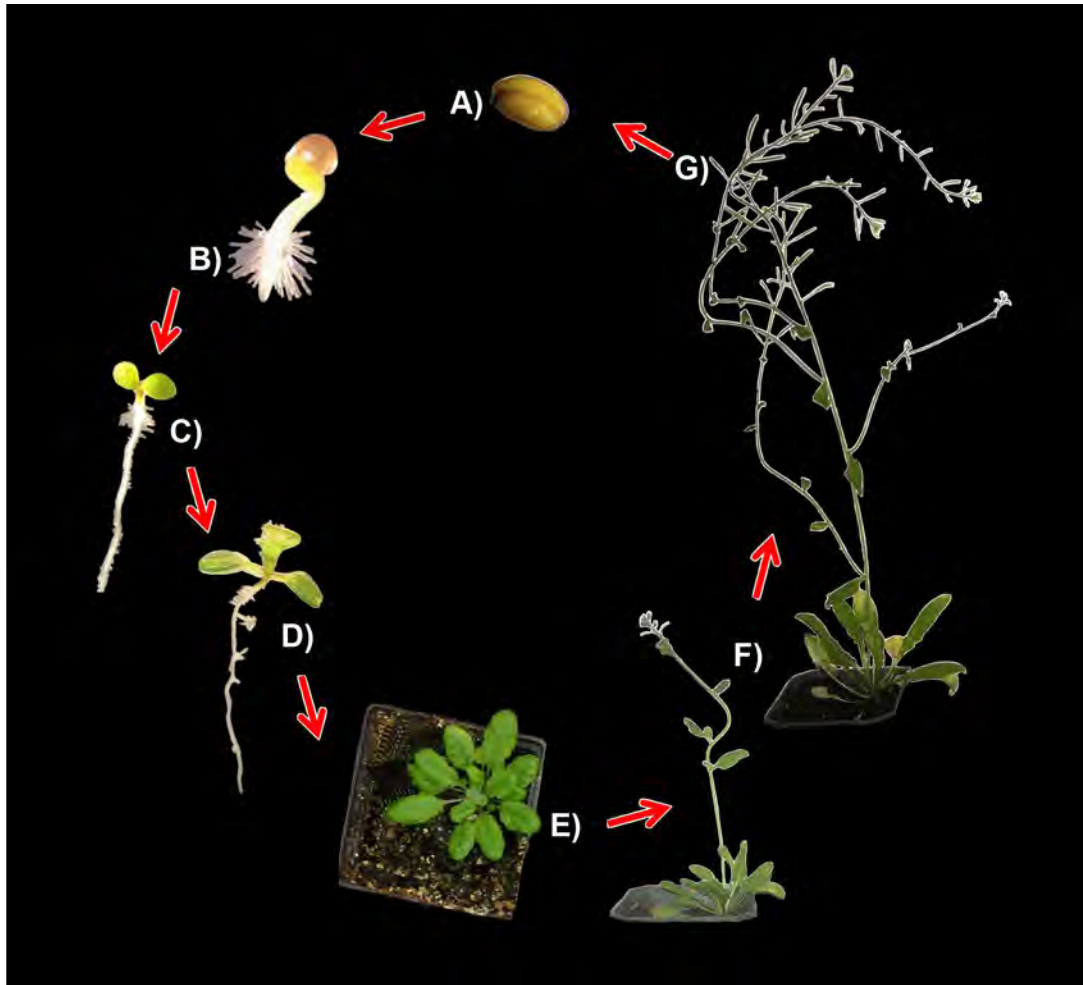


Figura 1. Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia en condiciones controladas. A) En el laboratorio, las semillas maduras son sometidas a un tratamiento de estratificación a 4°C durante dos días. B) Una vez colocadas en condiciones óptimas de germinación, la radícula protruye completamente en aproximadamente 48 horas. C) Posteriormente, los cotiledones de las plántulas elongan y se inicia la fase fotosintética. D) Cuando la roseta cuenta con alrededor de 10-14 hojas arregladas en una espiral filotáctica, E) se puede alcanzar la fase reproductiva al elongar un escapo proveniente del meristemo apical, F) que producirá flores hermafroditas que se autopolinizan para generar silicuas con 40-60 semillas. Las condiciones de crecimiento usadas fueron: Temperatura de 22 °C, fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad y una intensidad luminosa de aproximadamente 300 lúmenes.

2. El desarrollo de las estructuras reproductivas en *Arabidopsis*.

La flor es una estructura característica de las plantas angiospermas que protege a los órganos sexuales. Puede presentarse en una gran variedad de formas, colores y tamaños. Probablemente esta diversidad ha permitido la atracción de una variedad amplia de polinizadores y facilitado la dispersión de las semillas (Scutt y Vandebussche, 2014; Constanzo *et al.*, 2014).

Es probable que la gran diversidad de estructuras florales pudiera estar determinada por las características de los distintos hábitats en los que las especies vegetales se han adaptado y que esta diversidad haya sido relacionada con la radiación hacia nuevas zonas para colonizar (Scutt y Vandenbussche, 2014).

A nivel molecular y específicamente en *Arabidopsis*, el gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) codifica para una proteína que integra las señales ambientales de luz y temperatura que inducen la floración. El ARNm transcrito de *FT* en los cotiledones se traduce en una proteína que se moviliza a través del tejido vascular hacia el meristemo apical del brote (SAM, por sus siglas en inglés) donde se promueve la diferenciación al meristemo de inflorescencia (IM, por sus siglas en inglés). La formación subsecuente de los meristemas florales (FM's, por sus siglas en inglés) se desarrolla periféricamente al IM, expresando los genes que codifican para los factores de transcripción *LEAFY* (*LFY*) y *AINTEGUMENTA* (*AIN*), involucrados en la especificación y delimitación del FM. La actividad de estos dos factores de transcripción es regulada por *FT* (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010; Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2014).

La identidad del FM se establece mientras se incrementa la expresión de ciertos genes como son: *APETALA 1* (*AP1*), *APETALA2* (*AP2*) y *CAULIFLOWER* (*CAL*). A diferencia del SAM y del IM que son indeterminados, el FM es un meristemo determinado. Esta característica está regulada por la represión y la inducción del gen que codifica para el factor de transcripción *WUSCHEL* (*WUS*) por *AGAMOUS* (factor de transcripción de la familia *MADS*, *AG*) y *AP2* respectivamente. *WUS* se expresa en las células troncales del SAM, manteniendo su capacidad proliferativa, por lo que las mutantes *wus* carecen de un SAM y con ello de células con capacidad de diferenciarse (Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2014).

En la especificación del FM, éste se subdivide en cuatro regiones que darán lugar a los primordios de los cuatro verticilos florales, proceso en el que participan los genes homeóticos de la familia *MADS*; *AG*, *APETALA 3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) y *AP1*; además del gen *AP2*. Estos genes participan en el modelo ABC floral, donde la expresión diferencial y/o conjunta de ciertos genes regula la identidad de cada uno de los verticilos florales. *AG* participa en la identidad del gineceo y, junto con *AP3* y *PI*, en la identidad del androceo, los cuales son los verticilos sexuales (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010; Ó'Maoiléidigh *et al.*, 2014).

De forma general, el arreglo de la flor está determinado casi totalmente por genes homeóticos de identidad de los órganos florales, que se expresan a partir de los 11 a 13 días después de la germinación en *Arabidopsis* (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010).

A nivel anatómico, la conformación de una flor constituye un arreglo complejo de estructuras altamente especializadas con distintos tipos celulares (Yruela, 2015). En su madurez, la flor de *Arabidopsis* tiene una estructura característica de la familia Brassicaceae (Fig. 2). De afuera hacia adentro el cáliz se constituye de cuatro sépalos, la corola tiene cuatro pétalos con posiciones alternadas con los sépalos. Además de cuatro estambres medios y dos laterales y un gineceo súpero constituido por dos carpelos fusionados (Smyth *et al.*, 1990).

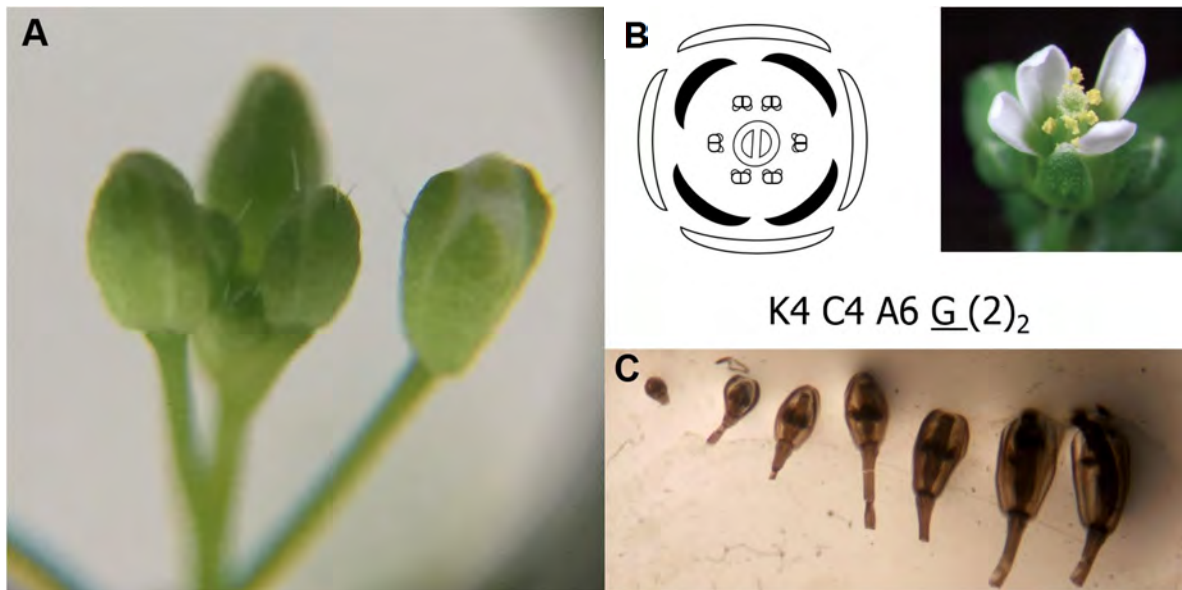


Figura 2. Flor de *Arabidopsis thaliana*. A) Arreglo de la inflorescencia en *Arabidopsis*. B) En el diagrama floral se representa a la flor de *Arabidopsis* como perfecta por contar con todos los verticilos posibles. Estructuralmente de afuera hacia adentro, la fórmula floral indica que la flor está constituida por cuatro sépalos (K), cuatro pétalos color blanquecino (C), seis estambres (A) y un gineceo con dos carpelos fusionados (G(2)₂). C) Imágenes de flores de *Arabidopsis* aclaradas en distintas fases de su desarrollo.

Los estambres representan al androceo en las flores. Consisten en filamentos constituidos principalmente por tejido epidérmico que recubre a tejido de parénquima y que tiene en su parte más interna al haz vascular. En el ápice del filamento se encuentran las anteras, las cuales están conformadas por un par de tecas unidas por tejido conectivo, el cual es continuación del filamento. Cada teca está integrada por dos sacos polínicos en donde se desarrolla el polen (Azcárraga *et al.*, 2010). El desarrollo del polen comienza en los seis estambres de *Arabidopsis*, dentro de las anteras en una fase temprana de desarrollo, las células madre de las microesporas se rodean de calosa, aislándose de esta forma de las células esporofíticas. En este proceso, las células madre entran concertadamente en meiosis para dar lugar a tétradas de microesporas haploides, cada

una rodeada de una pared de calosa, que posteriormente se liberan de la tétrada por acción de la calasa, la cual se produce en el *tapetum* y degrada la calosa que las envuelve. Las microesporas liberadas, se alargan y el citoplasma adopta una distribución polar que desencadena una mitosis asimétrica que da como productos una célula de mayor tamaño (célula vegetativa) y otra más pequeña (célula generatriz). Ambas células, componen el polen bicelular. La célula vegetativa no presenta más divisiones y da lugar al tubo polínico (Soto, 2009). La célula generativa pequeña, que se encuentra embebida dentro del citoplasma de la mayor, participa del segundo ciclo mitótico, simétrico en este caso, en el que se producen dos células espermáticas idénticas encargadas de la doble fecundación (McCormick, 2004). El momento en el que ocurre la segunda mitosis varía según la planta, en las brassicáceas y en los pastos sucede dentro de las anteras. Los pasos finales de la maduración del polen coinciden con la antesis y la dehiscencia de las anteras, finalizando con la liberación de los granos de polen deshidratados, listos para ser reconocidos por el estigma.

A nivel fisiológico, existe una amplia variedad de trabajos que han estudiado la forma en que las auxinas, fitohormonas que regulan varios mecanismos durante el desarrollo de las plantas. Intervienen en la producción y viabilidad de los granos de polen, la dehiscencia de las anteras y la elongación de los filamentos de los estambres. Mutantes dónde la síntesis, transporte, acumulación y señalización de auxinas a través de los estambres se ve afectada, producen cierto grado de esterilidad masculina (Cardarelli y Cechetti, 2014).

Por otra parte, el carpelo es una estructura que se encuentra generalmente en el centro de la flor, exceptuando a algunos miembros de la familia Triuridaceae (Scutt y Vandebussche, 2014) y su función principal es albergar a los óvulos (Bowman *et al.*, 1999) constituyendo al gineceo de la flor. El carpelo también participa en la función de discriminar entre los gametos masculinos que pudieran fecundar a los óvulos. En la mayoría de las especies, después de la fecundación, los carpelos se desarrollan para conformar a los frutos, los cuales protegen a las semillas, facilitan su dispersión mediante una amplia variedad de mecanismos (Bowman *et al.*, 1999). Algunas familias de angiospermas presentan más de un carpelo, por lo que el término gineceo puede referirse al conjunto de carpelos presentes. Cuando varios carpelos se encuentran unidos en una sola estructura, se denomina al conjunto gineceo sincárpico, si los carpelos se encuentran separados, se conocen como gineceo apocárpico (Bowman *et al.*, 1999). Durante la ontogenia del carpelo se reconocen dos tipos de fusión: la congénita que se refiere a una estructura compuesta

derivada de un solo primordio, y la postgenital u ontogénica, que involucra la formación de las superficies de forma independiente, donde las células epidérmicas que entran en contacto se re-diferencian en tejido parenquimatoso generando la unión de los carpelos (Bowman *et al.*, 1999).

En el gineceo de *Arabidopsis* al igual que en los de la familia Brassicaceae, los dos carpelos están fusionados congénitamente y constituyen un solo ovario, que culmina en la parte superior en un estilo sólido y corto, fusionado post-genitalmente, y un estigma apical (Bowman *et al.*, 1999). El estigma está compuesto por numerosas células epidérmicas elongadas en forma de papila, donde los granos de polen se adhieren y se reconocen previo al proceso de germinación y de fecundación (Ferrándiz *et al.*, 1999). Por debajo del ovario se encuentra un corto entrenudo llamado ginóforo, que conecta al gineceo con el receptáculo floral. El *septum*, que se encuentra dividiendo al ovario en dos lóbulos, sufre una fusión post-genital. La placenta parietal se desarrolla en los márgenes adaxiales de la fusión de los dos carpelos (Bowman *et al.*, 1999). El primordio del óvulo se origina como un órgano lateral derivado de la placenta (Galbiati *et al.*, 2013).

Los óvulos en *Arabidopsis* y de gran variedad de angiospermas están compuestos por la nucela, los tegumentos, el funículo y el saco embrionario que es el gametofito femenino. Su origen se da a partir de una única célula (arqueospora), que diferencia a un megasporocito o célula madre de las megasporas haploides, la cual entra en meiosis para producir cuatro megasporas de las que permanece sólo la más cercana a la región calazal (Shi y Yang, 2011). Esta megaspora sufre tres rondas de cariocinesis, formando finalmente el saco embrionario con ocho núcleos. Al final, los núcleos migran para formar las siete células: dos sinérgidas, tres antípodas, una ovocélula y la célula central binucleada (Shi y Yang, 2011). Los ápices de los tegumentos forman una abertura diminuta llamada micrópilo, por donde entrará el tubo polínico para realizar el proceso de fecundación.

Las auxinas participan activamente en los procesos de la formación del eje apical-basal del gineceo y en la diferenciación de estructuras como la papila estigmática. En mutantes donde el transporte de auxinas ha sido alterado, se presenta una pérdida del eje apical-basal y malformaciones durante el desarrollo del gineceo (Larsson *et al.*, 2013; Hawkins y Liu, 2014), que pueden disminuir la funcionalidad del gineceo. Al igual que en el caso de los gametos masculinos, las auxinas también están involucradas en el desarrollo adecuado de los óvulos dentro del gineceo.

El desarrollo de las estructuras reproductivas en *Arabidopsis* como modelo en las plantas ha sido estudiado extensamente, existen en la actualidad gran cantidad de trabajos que hacen especial énfasis en los mecanismos que regulan su desarrollo a nivel genético, hormonal y ambiental, pero los mecanismos moleculares que regulan estos procesos de desarrollo todavía no están completamente descritos.

3. *La fecundación en Arabidopsis.*

La fecundación ocurre previamente a la antesis floral y para ello es necesaria una sincronización de eventos ontogenéticos extensamente caracterizados en *Arabidopsis* (Smyth *et al.*, 1990). En esta planta, los primordios de los cuatro estambres más largos son visibles en los estadios florales 4-5, y continúan creciendo hasta diferenciarse los filamentos y las anteras. El desarrollo persiste hasta que se diferencian los lóculos de la antera. En los estadios 9-12 los estambres crecen rápidamente y alcanzan mayor altura que el gineceo en el estado de madurez.

Durante el estadio floral 10-11, el gineceo completa la diferenciación de las papilas estigmáticas (encargadas de recibir el polen), que serán receptivas hasta el estadio 12-13 (Smyth *et al.*, 1990). El correcto desarrollo y crecimiento del estambre es determinante para que se produzca en forma adecuada la fecundación.

Una vez que los estambres alcanzan la altura correcta del estigma papiloso, los granos de polen liberados se adhieren y se hidratan para germinar, produciendo el tubo polínico que penetra a través del tracto de transmisión en el interior del estilo (Iwano *et al.*, 2004). Cuando los tubos llegan hasta la zona del ovario donde se encuentran los óvulos, descargan los núcleos espermáticos, uno de ellos se fusiona con la célula huevo del saco embrionario (singamia) formando el cigoto $2n$, y el otro se fusiona con la célula central (triple fusión), formando el núcleo primario del endospermo $3n$, siendo estos procesos denominados doble fecundación y son característicos de las plantas angiospermas.

4. *La semilla de Arabidopsis*

El desarrollo de la semilla en *Arabidopsis* comienza después de realizarse la fecundación. La semilla está generalmente constituida por la cubierta seminal, recubrimiento más externo de origen materno, el endospermo, derivado de la triple fusión, que funciona como tejido de reserva y el embrión que en las dicotiledóneas está constituido por dos cotiledones y el eje embrionario. El endospermo puede ser abundante, escaso o no existir, dependiendo de la

especie (Azcárraga *et al.*, 2010), pero en *Arabidopsis*, una semilla madura, sólo posee una capa de endospermo remanente rodeando al embrión.

4.1 El desarrollo del embrión en *Arabidopsis*

Un aspecto importante del desarrollo embrionario después de la fecundación es el proceso de histodiferenciación. La primera división del cigoto genera una célula apical pequeña y una célula basal más grande. La célula apical se divide longitudinalmente y eventualmente da lugar a todas las estructuras apicales del embrión. La célula basal por su parte se divide transversalmente y produce el suspensor, estructura que conecta al embrión con el tejido materno en la semilla en desarrollo y a la hipófisis, que será el origen del (meristemo apical de la raíz (RAM, por sus siglas en inglés) (Fig. 3) (Jürgens, 2001; Lau *et al.*, 2012). Las auxinas desempeñan un papel determinante para la correcta diferenciación de las estructuras embrionarias. Mutantes de transportadores de eflujo de auxinas (*pin7*), fallan en la formación del eje apical-basal, lo mismo sucede con la aplicación de inhibidores de los transportadores de eflujo de las auxinas, comprobando así su importancia en estas etapas tempranas del desarrollo del embrión (Friml *et al.*, 2003). En etapas posteriores, el transporte, síntesis y percepción de las auxinas también es importante para la correcta formación del embrión maduro.

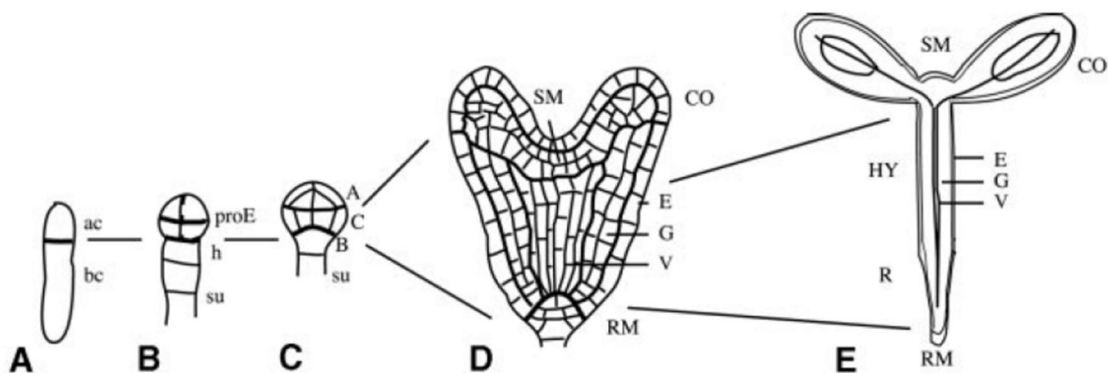


Figura 3. Esquema general del desarrollo embrionario. A) La división asimétrica del cigoto, genera una célula apical pequeña (ac) y una célula basal más grande (bc). B) En la fase de octante, el protoembrión (proE) se deriva de la célula apical, mientras que la célula basal produjo una fila de células que incluyen a la hipófisis (h) y el suspensor (su). C) En la fase de dermatógeno, se reconocen tres regiones en el embrión: apical (A), central (C) y basal (B). D) En la fase de corazón del embrión, se establece la polaridad del embrión, se notan el meristemo apical (SM), los primordios de los cotiledones (CO) y el meristemo radicular (RM), con tejido de epidermis (E), el tejido (G) y el primordio del tejido vascular (V). En esta fase, el embrión crece dentro de la semilla hasta dar origen a la plántula (E) que ya tiene un hipocótilo (HY), la raíz (R) y los cotiledones (CO). Tomado de Jürgens, 2001.

4.2 El desarrollo del endospermo en *Arabidopsis*

En *Arabidopsis*, en la transición de la etapa globular a la fase de corazón, el endospermo se mantiene sincicial casi a la par del desarrollo embrionario. Después de una fase inicial de rápida expansión, el endospermo comienza su celularización (Fig. 4), proceso que empieza en la zona micropilar alrededor del embrión en desarrollo (Fourquin *et al.*, 2016). La celularización del endospermo es importante para mantener la viabilidad del embrión. El uso de mutantes deficientes de MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), una proteína del tipo WD-40 que en otras especies eucariontes tiene una participación importante en el mantenimiento y modulación de la cromatina y que pertenece al complejo de FERTILIZACIÓN INDEPENDIENTE SEED POLYCOMB COMPLEX2 (FIS-PRC2), y en las cuales hay falla en la celularización del endospermo (Köhler *et al.*, 2003); ha permitido demostrar que este proceso es importante para mantener la viabilidad del embrión. Cierta porcentaje de semillas mutantes *msi1* y deficientes en la función de FIS-PRC2 son abortadas, pues los embriones quedan detenidos en distintas etapas del desarrollo de la semilla. Es interesante mencionar que el arresto embrionario puede liberarse al disectar los embriones y cultivarlos *in vitro*, apoyando la propuesta de que la falla de la celularización del endospermo es un causante del arresto del embrión (Hehenberger *et al.*, 2012). Mutantes deficientes en ENDOSPERM DEFECTIVE1 (EDE1) también muestran que el arresto de los embriones es consecuencia de la falla en celularización del endospermo (Pignocchi *et al.*, 2009).

Estudios recientes sugieren que los cambios en las propiedades de la pared celular durante el desarrollo del endospermo pueden estar relacionados con el crecimiento del embrión. El factor de transcripción específico del endospermo ZHOUP1 (ZOU), está involucrado en el desarrollo del endospermo. En los mutantes *zou*, la pared celular de las células del endospermo es más robusta y la degradación del endospermo no se efectúa, afectando notablemente el tamaño del embrión. Existe evidencia que sugiere que ZOU es un regulador en la expresión de genes que codifican para enzimas modificadoras de las pectinas involucradas en la degradación de la pared celular del endospermo, como lo es el mantenimiento de los epítopes (1-5) - α -L-arabinanos, que están asociados con ramnagalacturonanos I, durante la descomposición del endospermo (Fourquin *et al.*, 2016).

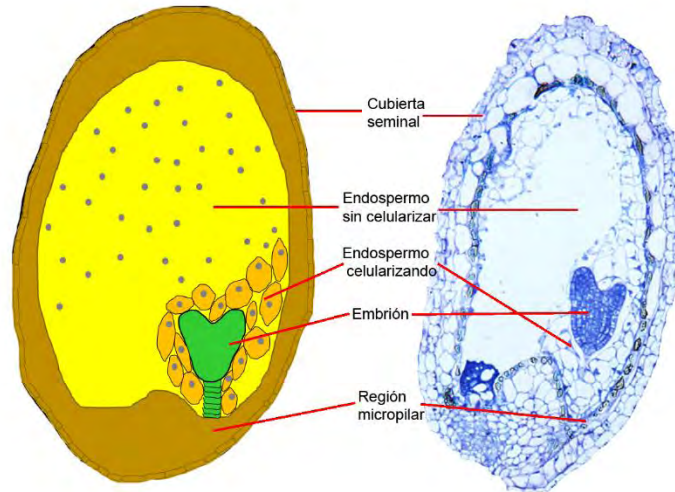


Figura 4. Esquema y corte longitudinal de la semilla durante el proceso de celularización del endospermo. En la fase de corazón tardío/torpedo del embrión, el endospermo comienza a celularizarse alrededor del embrión, inicialmente en la zona micropilar.

En una semilla madura de *Arabidopsis*, se observa que sólo persiste una capa de endospermo celularizado rodeando al embrión. Una hipótesis consistente con los antecedentes que relacionan el desarrollo del endospermo con el desarrollo del embrión implica la relevancia de la correcta celularización, el balance adecuado en la composición bioquímica de las paredes celulares y la posterior degradación de las células del endospermo, sugiriendo que el tamaño final y el plegamiento del embrión depende de las características bioquímicas y físicas que pudieran tener las células del endospermo además de su correcta degradación. La función canónica del endospermo es proveer de nutrimentos al embrión durante su desarrollo, fungiendo como un reservorio de hexosas que nutren al embrión vía apoplasto principalmente, pero, las implicaciones de restricción física que pudieran originarse por un endospermo persistente son temas de estudio actual y los mecanismos moleculares que regulan este proceso todavía no están bien esclarecidos (Fourquín *et al.*, 2016).

Estudios recientes que muestran relación entre el desarrollo del endospermo con regulación de tipo hormonal, muestran que las concentraciones de auxinas también están implicadas en la formación del endospermo inmediatamente después de la fecundación,

siendo moduladas por el complejo FIS-PRC2 a través de la regulación en la expresión de genes implicados en la síntesis de las auxinas (Figueiredo *et al.*, 2015). Su participación en etapas subsecuentes aún no ha sido descrita pero tampoco puede ser descartada.

Procesos del desarrollo de las plantas, donde las células se encuentran en fases de diferenciación, proliferación, elongación o muerte celular y, específicamente en los mencionados en los apartados anteriores, involucran cambios en la bioquímica de la pared celular vegetal, por lo que el estudio de esta estructura, el conocimiento de sus componentes principales y sus posibles modificaciones, es fundamental para entender cómo la bioquímica de la pared celular puede modular la formación de órganos y tejidos.

5. *La pared celular vegetal primaria*

Las células de las plantas son eucariontes, por lo que pueden generar estructuras tan complejas como las que poseen los animales, debido a que varios tipos celulares pueden constituir variedades de tejidos formadores de órganos (Taiz y Zeiger, 2010).

Las plantas presentan caracteres distintivos que las hacen diferentes en su morfofisiología a otros seres vivos. Una de estas características distintivas de una célula vegetal, es que además de tener una membrana celular cuentan con otra estructura denominada pared celular con características particulares que las diferencian de las de una bacteria o un hongo (Taiz y Zeiger, 2010).

La pared celular de las plantas es una estructura muy dinámica, en la que su arquitectura permite a las células vegetales mantener una forma definida, conferir soporte mecánico ante presiones físicas externas, mantener la comunicación intercelular en los distintos órganos de la planta (Somerville *et al.*, 2004) y ser la primera línea de defensa contra potenciales organismos patógenos.

La pared celular en las plantas se subdivide generalmente en primaria y secundaria. La pared celular primaria, se forma generalmente en células en crecimiento, proliferación y diferenciación. Por otra parte, la pared secundaria se genera de células que han alcanzado su máximo estado de crecimiento y diferenciación; son distinguibles por su grosor, además de su composición en moléculas tales como la lignina (Somerville *et al.*, 2004).

La composición de la pared celular primaria varía dependiendo de la especie, del tipo celular y hasta del dominio subcelular dentro de la misma pared (Wolf *et al.*, 2012).

Generalmente, está conformada por fibras de celulosa, un polímero de glucosas unidas por un enlace β (1-4), que pueden entrecruzarse con distintos tipos de hemicelulosas. Estructuralmente las hemicelulosas se constituyen de cadenas largas de monómeros de pentosas como, por ejemplo: la xilosa y la arabinosa, hexosas como la manosa y la fucosa, que pueden estar acompañadas por ácidos urónicos. Estos polisacáridos interactúan con las fibras de celulosa, constituyendo un esqueleto que se encuentra dentro de una matriz de pectinas, otro tipo de polisacáridos muy abundantes en la pared celular. Además, también existen dentro de la pared celular primaria distintos tipos de proteínas tanto estructurales como con actividad enzimática que se involucran activamente en re-modelar la arquitectura de la pared celular (Carpita y Gibeaut, 1993).

Dentro de las proteínas que constituyen la pared celular que no tienen actividad catalítica conocida, se encuentran las expansinas, las cuales se cree están encargadas de romper enlaces entre pectinas y celulosa, por ello se les ha atribuido la capacidad de regular la expansión celular bajo condiciones determinadas. Son proteínas codificadas por familias multigénicas en donde los grupos de α -expansinas comparten sólo el 20% de identidad en aminoácidos con las β -expansinas (Cosgrove, 2000). Los genes de esta familia se expresan de forma diferencial en condiciones de expansión celular, y son inducidas también por varios agentes que inducen este proceso. Las expansinas también se cree que promueven la reorganización de las microfibrillas de celulosa a través de la ruptura de puentes de hidrógeno entre la celulosa y los xiloglucanos, además de otro tipo de enlaces no covalentes (Cosgrove, 2000).

Otras proteínas presentes en la pared celular son las proteínas ricas en hidroxiprolina, en donde se encuentran clasificadas las proteínas con actividad de extensina, las cuales están relacionadas con el crecimiento celular (Kieliszewski y Lamport, 1994). Son producidas de forma diferencial en presencia de etileno (Bucher *et al.*, 2002), además de que se relacionan con la resistencia de la pared y la protección frente a patógenos (Plancot *et al.*, 2014). Para que las células puedan aumentar de tamaño se requiere una distensión de las estructuras químicas conformadas dentro de la pared, para romper conformaciones de moléculas sin necesidad de actividad catalítica.

Se conoce que el aumento de la hidratación favorece la extensibilidad de la pared celular en las plantas. Esto es presumiblemente el resultado de la mayor separación entre las microfibrillas de celulosa en la pared hidratada, lo que posiblemente facilite su reordenamiento al generarse más espacio. Para las paredes con varias laminas, esta

reorganización implica la rotación de las microfibrillas, observada recientemente en la raíz de *Arabidopsis*.

Por otra parte, las proteínas ricas en prolina se conocen que intervienen en el desarrollo del tejido vascular y la cicatrización de heridas por herbivoría y las proteínas ricas en glicina coordinan el desarrollo normal de estructuras de órganos, también están relacionadas con la formación de nódulos para la fijación de nitrógeno.

Existen también al menos ocho familias de proteínas con dominio de función desconocida (DUF) detectadas en la pared celular. Varios miembros de estas familias podrían intervenir en procesos que regulan la arquitectura de la pared celular o que regulan distintas vías de señalización; eventos relacionados con el desarrollo de la planta y su protección contra patógenos (Zúñiga-Sánchez y Gamboa-de Buen, 2012).

Dentro de los componentes de la pared celular que pueden modificarse químicamente por medio de proteínas con actividad enzimática se encuentran las pectinas. Estos cambios químicos pueden tener relevancia al regular eventos en el desarrollo de las plantas tan importantes como la organogénesis.

Antecedentes del proyecto

6.1 Las pectinas

Las pectinas son moléculas compuestas principalmente por residuos de ácido D-galacturónico (GalU) unidos por enlaces α (1 \rightarrow 4). Los grupos carboxilo del carbono número 6 del GalU pueden estar metil-esterificados o permanecer libres y los oxígenos número 2 o 3 pueden estar acetilados. Los grupos carboxilo libres, si están disociados, podrían dar lugar a interacciones electrostáticas con iones calcio (Ca^{2+}) entre las cadenas de pectinas vecinas.

Los homogalacturonanos (HG's), son el tipo pectinas más abundante, con aproximadamente el 23% del peso seco de la pared celular foliar total en *Arabidopsis* (Caffall y Mohnen, 2009). Se polimerizan en el aparato de Golgi mediante glicosiltransferasas, y se sustituyen los grupos metilo en la posición C6, para ser exportadas a la pared celular casi totalmente metil esterificadas. En la pared, las pectin metil estererasas (PME's), proteínas con actividad enzimática, pueden eliminar los grupos metilo y alterar las propiedades químicas de las pectinas. Como resultado de la actividad de PME's, las pectinas presentan grupos carboxilo cargados negativamente, siendo liberados metanol y protones (Fig.5) (Wolf y Greiner, 2012).

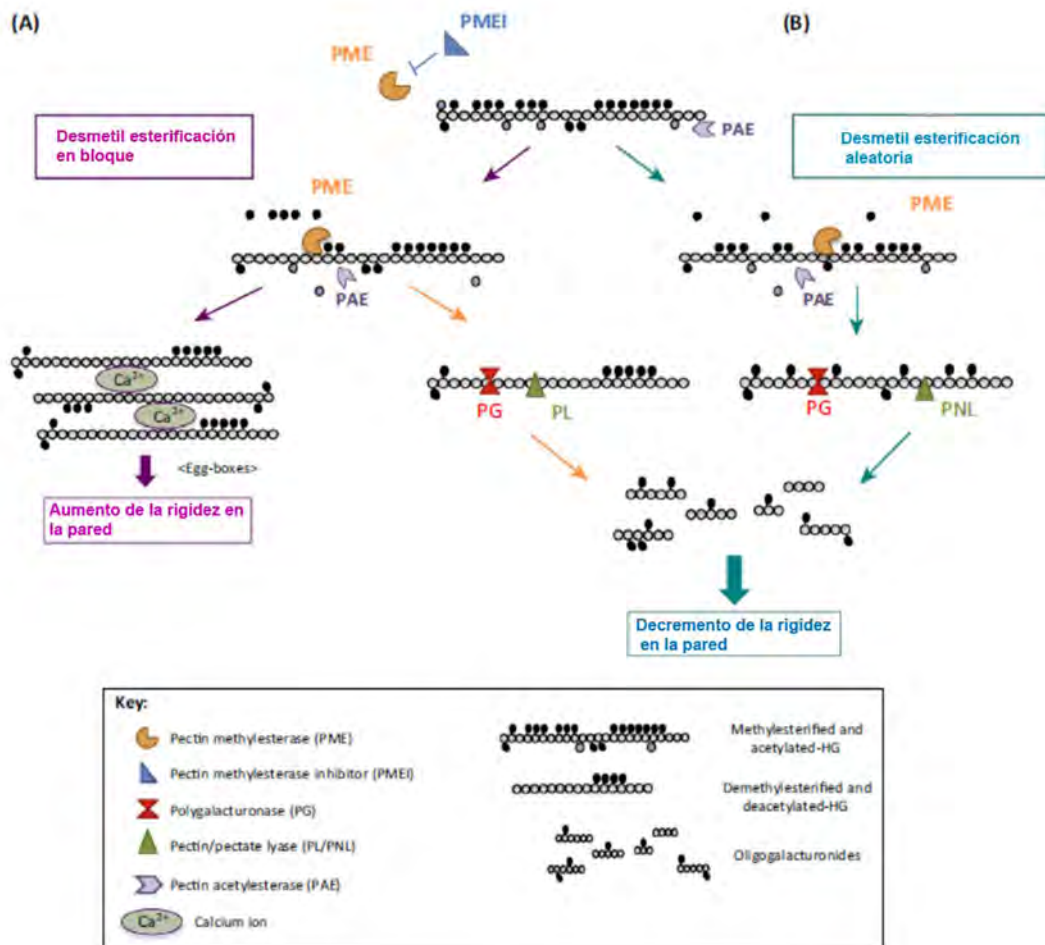


Figura 5. Desmetilesterificación de las pectinas y sus posibles consecuencias en la estructura de la pared celular primaria. Los homogalacturonanos ingresan en la pared celular casi completamente metil esterificados. Las pectin metil esterases (PME's), son enzimas que eliminan los grupos metilo de los homogalacturonanos y su función es regulada por inhibidores de pectin metilesterasas (PMEI's). La desmetil esterificación de las pectinas puede efectuarse en bloque (A), donde las cargas negativas en las cadenas de pectinas pueden interaccionar con moléculas de agua, promoviendo la relajación de la pared al ser sustrato de las poligalacturonasas (PG's) o unir Ca^{2+} y fortalecer la unión entre cadenas promoviendo un aumento en la rigidez de la pared celular. De forma aleatoria (B), una vez removidos los grupos metilo, el pH ácido generado por los protones regula la función de otras enzimas remodeladoras de la pared celular como son las PG's y/o las pectin/pectato liasas (PL/PNL) que pueden degradar completamente a las pectinas generando oligogalacturónidos y propiciando una pared celular más laxa (Tomado de Hocq *et al.*, 2017).

Las PME's se encuentran distribuidas en todas las estructuras y a lo largo del desarrollo de las plantas al igual que las auxinas. Trabajos realizados desde los años 50's, propusieron que la actividad de las PME's se encontraba regulada por las auxinas y que tal vez podrían estar interviniendo directamente en el sitio catalítico de la enzima (Glasziou, 1957). Actualmente, se conoce la importancia de la desmetil esterificación de las pectinas en el

meristemo apical, para dar origen a primordios de órganos, por medio de la distribución puntual de las auxinas. Experimentalmente, la planta sobre expresora del inhibidor de PME's 3 (OEPMEI3) mostró una deslocalización del transportador de auxinas PIN1, mientras su pared celular se observaba más rígida, debido a una menor desmetil esterificación de las pectinas (Braybrook y Peaucelle, 2013).

Existen también otras proteínas llamadas inhibidores de pectin metil esterasas (PMEI's) que están involucradas en la regulación de la actividad de las PME's. Análisis de genomas de varias especies de plantas mostraron que las PME's y los PMEI's pertenecen a grandes familias multigénicas (Wolf *et al.*, 2009). En *Arabidopsis* por ejemplo, se han detectado 66 marcos de lectura abiertos (ORF's) como supuestas PME's de longitud completa y 69 ORF's para PMEI's. En general, el número de isoformas de PME's y PMEI's parece ser menor en las monocotiledóneas *Oryza sativa* y *Brachypodium distachyon* en comparación con las especies dicotiledóneas (*Arabidopsis thaliana* y *Populus trichocarpa*) (Pelloux *et al.*, 2007). Estos datos son consistentes con que los HG's son menos abundantes en las gramíneas, pero, es probable que aun cuando hay una menor cantidad de PME's y PMEI's, su participación desempeñe un papel sustancial en el desarrollo de las monocotiledóneas.

Otro grupo de proteínas con actividad enzimática son las poligalacturonasas (PG's). Su función se ha descrito en la degradación de las pectinas desmetil esterificadas y están reguladas por proteínas que inhiben la actividad enzimática de las PG's, los inhibidores de poligalacturonasas (PGIP's). Su presencia en momentos específicos del desarrollo de la planta y su respuesta a estímulos ambientales u hormonales puntuales ha sido estudiada en distintos modelos de plantas (González-Carranza *et al.*, 2007). Particularmente se ha propuesto que tienen el papel de evitar que los patógenos puedan infectar a las plantas fácilmente. En experimentos con plantas que sobreexpresan estos inhibidores en *Arabidopsis*, las plantas mostraron más resistencia al patógeno *Fusarium graminearum*, el cual secreta PG's para degradar la pared celular e infectar a las plantas (Ferrari *et al.*, 2012). La PGIP FLOR1 participa en la floración. Las mutantes *flor1* presentan un tiempo de floración retardado (Torti *et al.*, 2012).

En la actualidad, estudios enfocados en una familia de proteínas miembros de DUF, que han sido detectadas en la pared celular, sugieren que podrían estar involucradas de forma relevante en distintos procesos del desarrollo de las plantas, involucrando la modulación del grado de desmetil esterificación de las pectinas, por lo que estudios más profundos enfocados en estas proteínas es determinante para comprender la fisiología involucrada en el desarrollo de las plantas.

6.2 Proteínas de la familia DUF642

La familia de proteínas DUF642 tiene diez miembros en *Arabidopsis*, de los cuales seis han sido detectados en distintos proteomas de pared celular. Esta evidencia sugiere que la función de las proteínas DUF642 podría ser relacionada con la regulación de la pared celular. Esta familia está muy conservada y es específica de las plantas espermatofitas, sugiriendo su participación en la radiación de las plantas que producen semillas a ambientes muy distintos (Vázquez-Lobo *et al.*, 2012).

La estructura primaria de estas proteínas se encuentra dada por un péptido señal, codificado por el primer exón, y el dominio DUF642, que se codifica por los exones II y III.

El modelo de predicción estructural de esta familia elaborado con distintos programas computacionales sugiere la unión del dominio DUF642 a polisacáridos. Estudios *in vitro* han demostrado que la proteína At3g08030, integrante de esta familia se une a celulosa y a hemicelulosa (Vázquez-Lobo *et al.*, 2012). Por otro lado, las proteínas At4g32460 (BIIXI, BDX) y At5g11420 interactúan *in vitro* con la pectin metil esterasa 3 (*AtPME3*, At3g14310) presente en el tejido vascular (Guénin *et al.*, 2011; Zúñiga-Sánchez y Gamboa-de Buen, 2012), sugiriendo que su participación podría efectuarse al modular al menos indirectamente el grado de esterificación de las pectinas.

BDX es un gen que se expresa en el tejido vascular de embriones y plántulas, en las venaciones de las hojas, en las papilas estigmáticas, los estambres y los pétalos en *Arabidopsis* (Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014). Se ha visto que las líneas de sobreexpresión de los genes *BDX* y *At5g11420* presentan un fenotipo en la germinación relacionado con la modulación en la actividad de las PME's; se detectó un aumento en la tasa de la ruptura de la testa, proceso relacionado directamente con un aumento de la actividad de las PME's (Muller *et al.*, 2013; Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014). Las líneas de menor expresión de *BDX* presentan un fenotipo de silicuas más cortas tanto en una línea de T-DNA (*bdx-1*) como en la línea antisentido (ASBDX), con menor producción de semillas. La línea *bdx-1* presenta anomalías morfológicas visibles en las semillas con variación en el tamaño con respecto a las de la línea silvestre.

Por otra parte, se ha demostrado *in vivo* que otro miembro de la familia DUF642 At2g41800 (TEEBE, TEB) es una proteína de pared celular, y puede regular el grado de desmetil esterificación de las pectinas, generando una regulación fina en la elongación de

células del hipocótilo (Salazar-Irribé *et al.*, 2016), además de que incrementa su expresión en plantas que son atacadas por *Meloidogyne* (Salazar-Irribé *et al.*, 2017) al igual que lo hace el gen *BDX*.

Otro gen de la familia DUF642, *At5g25460* (*DUF642-L-Gall-responsive gene 2*, *DGR2*) también aparenta ser importante en el desarrollo vegetal. Las mutantes nulas para el *DGR2*, presentan una raíz corta sin alteraciones morfológicas en la zona meristemática y la parte aérea de la planta es más pequeña con respecto a la línea silvestre (Gao *et al.*, 2012).

Análisis heterólogos también han demostrado que los miembros DUF642 de otras especies vegetales están implicados en la modulación del grado de desmetil esterificación de las pectinas. *AhDGR2* es un gen DUF642 en *Amaranthus* que se expresa altamente durante condiciones de estrés abiótico. La sobreexpresión de *AhDGR2* en *Arabidopsis* moduló diferencialmente la actividad de PME's, con un aumento en el tejido de la raíz, pero con disminución en las hojas. Estos cambios en la actividad de PME's se correlacionaron con la abundancia de pectinas con bajo grado de metil esterificación. Las semillas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron a *AhDGR2* mostraron, mayor sensibilidad al ácido abscísico (ABA) y al NaCl durante la germinación (Palmeros-Suárez *et al.*, 2017). También se ha observado un aumento en la actividad de PME's en frutas, hojas, plántulas y ápices de los brotes de plantas de tomate que sobreexpresan un gen DUF642 en *Vitis quinquangularis*. Estas plantas también generan mayor resistencia a la infección del hongo *Botrytis cinerea* (Xie y Wang, 2016).

Los antecedentes que se tienen sobre la participación de las proteínas DUF642 y en específico del fenotipo de las líneas mutantes y antisentido de *BDX*, sugiere un papel importante de este gen en el desarrollo de las estructuras reproductivas de *Arabidopsis*. Su participación podría llevarse a cabo en diferentes etapas en el desarrollo del gineceo, del androceo y de la semilla a través de cambios bioquímicos y físicos en las paredes celulares, por medio de la regulación del grado de desmetil esterificación de las pectinas.

Hipótesis general

Dado que la pared celular es una estructura determinante a lo largo del desarrollo de las plantas, alteraciones en el grado de desmetil esterificación de las pectinas podrían modificar el grado de rigidez de la pared celular, promoviendo alteraciones fenotípicas importantes en el desarrollo de las estructuras reproductivas en *Arabidopsis*. BDX es una proteína que fungiría como un modulador del grado de desmetil esterificación, por lo que su importancia sería determinante en la adecuada formación de distintas estructuras de la planta.

Objetivo general

Establecer la posible función de BDX como modulador del grado de desmetil esterificación de las pectinas en la pared celular, y su posible relación con el desarrollo de las estructuras reproductivas y de la semilla.

Objetivos particulares

- Describir las alteraciones durante el desarrollo de las estructuras reproductivas en las líneas de menor expresión de *BDX* de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia.
- Establecer la función de BDX, en relación con la metil esterificación de las pectinas en la pared celular y su posible efecto en la acumulación y/o distribución de las auxinas.

Materiales y métodos

Material biológico

Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (WT) y de las distintas líneas transgénicas se crecieron en macetas con suelo o en cajas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS) (pH 5.7) en una cámara (E-15, Conviron, Manitoba, Canadá) en condiciones de fotoperiodo luz/oscuridad 16/8 horas o bajo luz continua a 21°C.

Las plantas sembradas en el medio MS con tres o cuatro hojas verdaderas fueron transplantadas a macetas con sustrato donde continuaron su crecimiento hasta la floración.

En este punto, se realizó una colecta de flores en varios estadios de desarrollo para ser fijadas.

Por otra parte, gineceos polinizados en donde se conocía que el desarrollo de la semilla había comenzado, también fueron colectados y fijados en formaldehído al 4% para disectar las semillas en distintas fases de desarrollo embrionario.

En otra colecta y después del periodo de desarrollo y maduración completa de la silicua en WT Col, *bdx-1* y ASBDX se obtuvieron semillas las cuales fueron limpiadas y medidas con el programa ImageJ, donde se tomó de referencia los valores de longitud (distancia de la zona micropilar a la región calazal) y diámetro (un trazo perpendicular a la longitud) de las semillas (Fig. 6).



Figura 6. Mediciones de longitud (rojo) y diámetro (azul) de las semillas de *Arabidopsis*.

Para la medición de la longitud final de la silicua y el número de semillas por silicua, se hicieron tres réplicas independientes en donde se midieron del receptáculo a la punta de los restos del estigma en las silicuas maduras de WT Col, *bdx-1* y ASBDX crecidas en condiciones de fotoperiodo 16/8 y bajo luz continua. De diez plantas por línea, se tomaron 20 silicuas de las cuales se contó individualmente el número de semillas producidas.

Germinación y sobrevivencia de las plántulas.

Semillas *bdx-1* normales (n= 15-25) y amorfas (n= 15-25) de lotes no más longevos a un año fueron vernalizadas durante dos días a 4°C y germinadas en medio MS como se ha descrito anteriormente. Tres réplicas independientes fueron diseñadas cuantificando el número de semillas germinadas por cada grupo de semillas *bdx-1*. Las plántulas sobrevivientes en ambos grupos fueron transplantadas a suelo y se monitoreó su

sobrevivencia hasta la generación del meristemo de inflorescencia, para obtener el porcentaje de sobrevivencia.

Ensayos de elongación de tubo polínico.

a) In vitro

Granos de polen obtenidos de flores maduras de WT Col, *bdx-1* y ASBDX fueron colocados en un medio de crecimiento con 5 mM MES (pH 6-6.5), 1 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 1.5 mM ácido bórico, sacarosa al 16.6% y 0.25 mg de extracto de levadura en Agarosa al 0.7%.

Los granos de polen se incubaron a 25°C en una cámara húmeda 6 y 16 horas, reportadas como suficientes para encontrar la máxima longitud de elongación del tubo polínico (Fan *et al.*, 2001).

Se revisaron aproximadamente 200 granos de polen por línea y se cuantificó cuántos de ellos habían producido el tubo polínico. Se elaboraron cuatro repeticiones del experimento y se compararon los porcentajes finales de granos de polen con elongación de tubo polínico. Para ASBDX se utilizaron solamente 100 granos por la dificultad de la obtención de los granos.

b) In vivo

Flores maduras sin polinizar fueron seleccionadas para emasculas sin ser cortadas del cuerpo de la planta. Con anteras maduras provenientes de flores de las mismas líneas fueron polinizadas manualmente y después de 3 horas las flores fueron disectadas y almacenadas en 4% de paraformaldehído durante 24 horas. Posteriormente fueron incubadas en azul de anilina durante 3 horas en oscuridad total y analizadas bajo el microscopio óptico de fluorescencia Leica DM 1000 (Ryan *et al.*, 1998).

Nutrición

Se crecieron plantas WT Col, *bdx-1* y ASBDX en macetas con suelo en una cámara (E-15, Conviron, Manitoba, Canadá) en condiciones de fotoperiodo luz/oscuridad 16/8 horas a 21°C. Una vez que se desarrollaron las primeras dos silicuas, fueron sometidas a una

condición de oscuridad total durante 48 hrs. Posteriormente se regresaron a la condición de fotoperiodo normal para permitir a las plantas recuperarse. Utilizando PCR en tiempo real, se obtuvo la expresión de dos genes llamados de “inanición” para comparar la expresión entre la línea *bdx-1* con respecto a la expresión en la WT.

Plantas Transgénicas

Se realizaron cruces de gineceos *bdx-1*, con fenotipo de vainas cortas con granos de polen de las plantas DR5-GFP, la cual es una línea homocigota. Las plantas fueron analizadas por medio de PCR a partir del ADN genómico para verificar la presencia de GFP y con ello del tándem DR5. Se obtuvieron dos líneas independientes.

El ADN genómico para verificar la presencia de la GFP fue extraído de hojas de roseta e inflorescencias utilizando el método de alcohol isoamílico fenol cloroformo Invitrogen (N° de catálogo 15593031) según las instrucciones del proveedor (anexo 1 A).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tiempo real.

Inflorescencias completas y hojas de roseta de plantas sometidas al tratamiento de oscuridad y crecidas en condiciones normales, fueron colectadas para la extracción de ARN total usando el método de Trizol, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (anexo 1 B).

Para cuantificar el ARN se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop lite; Termo scientific) y se verificó la integridad del mismo en un gel de agarosa al 1%. El ADNc fue sintetizado a partir de 100 ng de ARN tratado con DNAsa-I (Qiagen, Valencia, CA, USA) utilizando superscript II reverso transcriptasa Invitrogen (N° de catálogo 18064) y oligo (dT) primers (anexo 1 C).

Para la amplificación se utilizó SYBR Green master mix con una plataforma de Applied Biosystems StepOne. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 50°C durante 2 min. Para la activación de la ADN polimerasa, 95°C durante 10 min. Seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min. A 60°C y 15 s a 95°C para el análisis de la curva “melt”.

Se realizaron máximo tres réplicas biológicas independientes con tres réplicas técnicas. *ACT7 (At5g09810)*, fungió como control endógeno.

Para analizar los niveles de los transcritos se diseñaron los siguientes primers: sentido 5'-AGACGAGCTTAGGGTGTTC-3' y antisentido 5'-CGCCACATTTATGACACCTG-3' para *ATL8* (*At1g76410*), sentido 5'-TGGAACGATGATGGTGAAGA-3' y antisentido 5'-AACCAGAGGGAGTGTTC-3' para *KMD4*. (*At3g59940*).

Los datos fueron analizados comparando los valores de Ct utilizando el modelo matemático propuesto por Schmittgen y Livak, 2008 para obtener el cociente de expresión relativa $2^{-\Delta CT}$. Los datos se transformaron con base en el logaritmo natural antes de aplicar la prueba T de Student.

Pruebas de inmunohistoquímica

Las muestras de flores fueron fijadas en solución FAA (formaldehído al 4%, ácido acético al 2% y etanol al 50%) y las semillas en formaldehído al 4% e infiltradas con vacío durante 20 minutos. Se mantuvieron en las respectivas soluciones fijadoras durante 24 horas y se procedió a una deshidratación por medio de lavados en un tren de etanoles graduales (25, 50, 75, 85, 96 y 100%) diluidos en agua destilada. Se incluyeron en la resina plástica LR-White (N° de catálogo 14381-UC, Electron Microscopy Sciences). Las muestras incluidas se cortaron en un ultramicrotomo para resinas RMC-MT990 con un grosor de 2 o 4 μm para las flores y 1 μm para las semillas.

Se hicieron cortes longitudinales y transversales de las flores y para las semillas se trataron de obtener planos donde se viera perfectamente el desarrollo embrionario y del endospermo. Una serie de cortes fueron tratados con una tinción de azul de toluidina al 1%, para ser revisados y fotografiados bajo el microscopio óptico Olympus.

Otra serie de cortes correspondientes a los fotografiados con azul de toluidina fueron montados en portaobjetos silanizados y tratados para técnicas de inmunolocalización de pectinas parcialmente esterificadas, desmetil esterificadas y contra el transportador de eflujo de auxinas PIN1.

Las muestras fueron hidratadas con 1% de (Phosphate-buffered saline, PBS) para ser incubadas con el anticuerpo primario correspondiente: antiJIM5 (rata, de Plant Probes) en dilución 1:50, antiJIM7 (rata, de Plant Probes) en dilución 1:50, anti-PIN1 (cabra, aP20 de Santa Cruz) en dilución (1:100), anti-LM19 (rata, de Plant Probes) en dilución (1:50) y anti-LM20 (rata, de Plant Probes) en dilución (1:50) durante 12 hrs. a 4 °C. Después del lavado del anticuerpo primario fueron incubadas con el anticuerpo secundario chicken anti-goat

con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:50, Molecular Probes) y con el anticuerpo secundario goat anti-rat con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:50, Molecular Probes) según correspondiera por cuatro horas a temperatura ambiente (22°C). Los controles negativos fueron elaborados al mismo tiempo sin la incubación del anticuerpo primario, pero con la incubación del anticuerpo secundario.

Microscopía confocal

Los tejidos de plántulas, flores, silicuas y semillas fueron visualizados a 576-670 nm para el yoduro de propidio (IP Invitrogen) y de 485-545 nm para la GFP utilizando un microscopio de exploración de laser confocal (Olympus FV 1000, Tokyo, Japón). Asimismo, las muestras para inmunohistoquímica fueron analizadas para el segundo anticuerpo ALEXA- 488.

Las imágenes de plantas sin fluorescencia que sólo fueron incubadas con el anticuerpo secundario fueron usadas como control negativo. Las imágenes fueron ensambladas con Image-J para su edición final en Adobe Photoshop v. 5.0 (Adobe systems, San José, CA, USA).

Resultados y organización de la tesis.

Capítulo 1. Participación de BDX en el desarrollo de las estructuras reproductivas de *Arabidopsis*.

En este capítulo, se describe la alteración reproductiva que tienen las líneas de baja expresión de *BDX* (mutante *bdx-1* y antisentido *ASBDX*), que presentan una disminución drástica en el contenido de semillas por silicua crecidas en condiciones de fotoperiodo largo y bajo luz continua (Fig. 7) consistentes con lo obtenido por Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014.

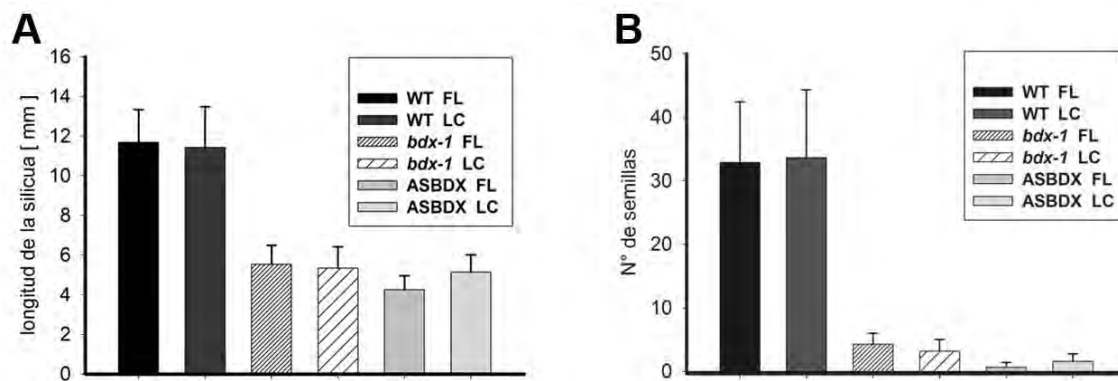


Figura 7. Fenotipo de las líneas de menor expresión de *BDX*. A) Longitud de las silicuas y B) Número de semillas de las líneas *bdx-1* y ASBDX en condiciones de fotoperiodo largo (FL) y luz continua (LC). n= 8-11 plantas distintas y tomando las medias de 20 silicuas por cada planta.

Las plantas con menor producción de semillas y/o que presentan variaciones en el tamaño del fruto pueden tener algún tipo de esterilidad parcial debida a la formación de los granos de polen y su potencial para fecundar a los óvulos, por lo que los estudios histológicos de los distintos órganos de la flor y en distintas fases de su desarrollo, muestran regularmente el posible origen de los problemas reproductivos que pueda presentar una planta.

Para establecer las comparaciones durante el desarrollo de las estructuras reproductivas entre las diferentes líneas, las muestras de las flores en diferentes estadios se tomaron con base en los estadios descritos por Alvarez-Buylla *et al.*, 2010 (Fig. 8). En este análisis fueron utilizadas flores en una fase donde el androceo y gineceo están diferenciados perfectamente (entre los estadios 7-8 de desarrollo), flores completamente desarrolladas, en las que no ha ocurrido la polinización (estadios 11-12) y flores fecundadas (estadio 13) (Fig. 9).



Figura 8. Estadios del desarrollo de la flor en *A. thaliana* (Tomado de Alvarez-Buylla *et al* 2010).

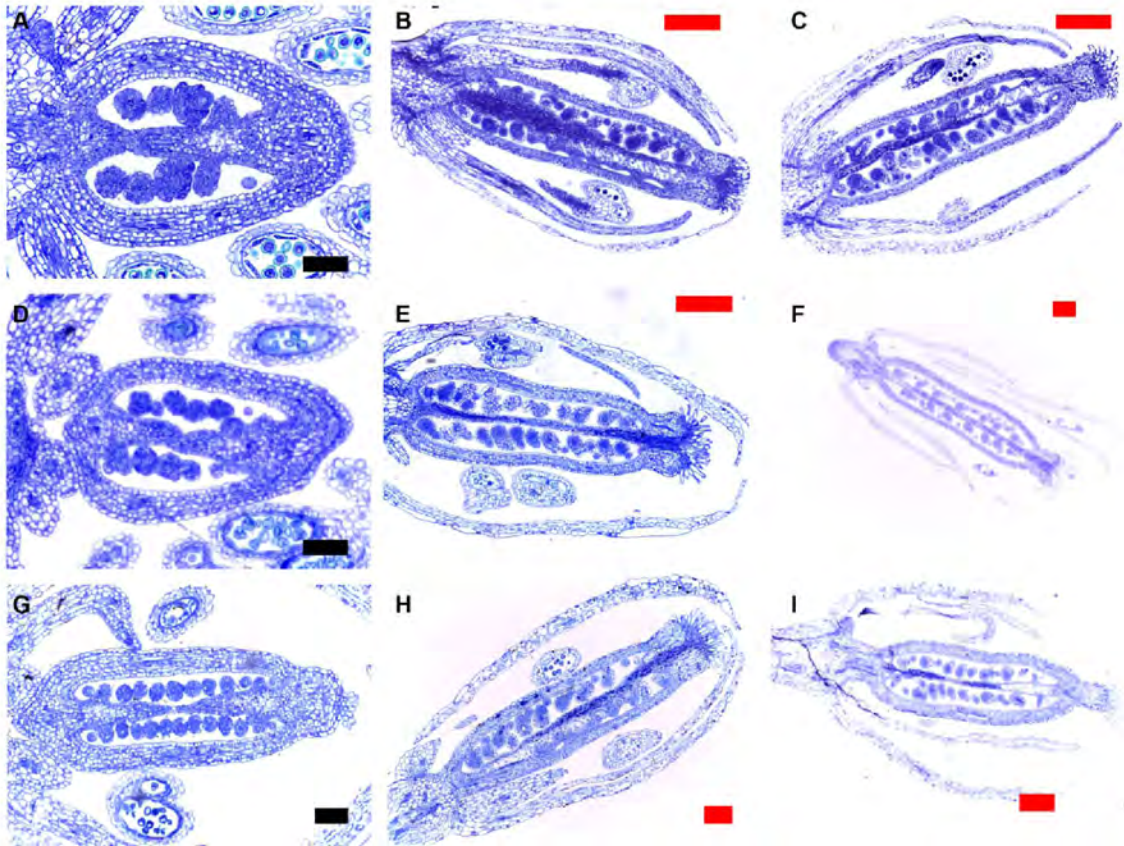


Figura 9. Estudios histológicos realizados en distintos estadios del desarrollo de la flor en *Arabidopsis*. (A, B, C) pertenecen a WT; (D, E, F) corresponden a la mutante *bdx-1*; (G, H, I) representan a las flores de ASBDX. A), B), G) representan a la flor en una fase temprana de desarrollo; B), E), H) representan la flor completamente desarrollada, C), F), I) corresponden a imágenes que representan un estadio donde la fecundación ya se realizó. Cortes de 1-2 μm de grosor. Tinción con azul de toluidina. Barras negras = 20 μm ; Barras rojas = 100 μm . n= 8-10 plantas para cada línea.

El análisis de los cortes en la fase temprana del desarrollo de la flor mostró que tanto en la línea *bdx-1* como en la línea de ASBDX, los granos de polen presentan una pared íntegra además del citoplasma nucleado similar a los de la WT. En la flor ya madura pre y post-fecundación, algunos granos de polen de la línea *bdx-1* presentan alteraciones morfológicas muy visibles; colapsados y sin citoplasma en su interior (Fig. 10 E, F). La línea ASBDX por otra parte, produce granos de polen con citoplasma difuso y sin núcleos generalmente, y sus paredes parecen conformadas sin alteraciones visibles (Fig. 10 H, I).

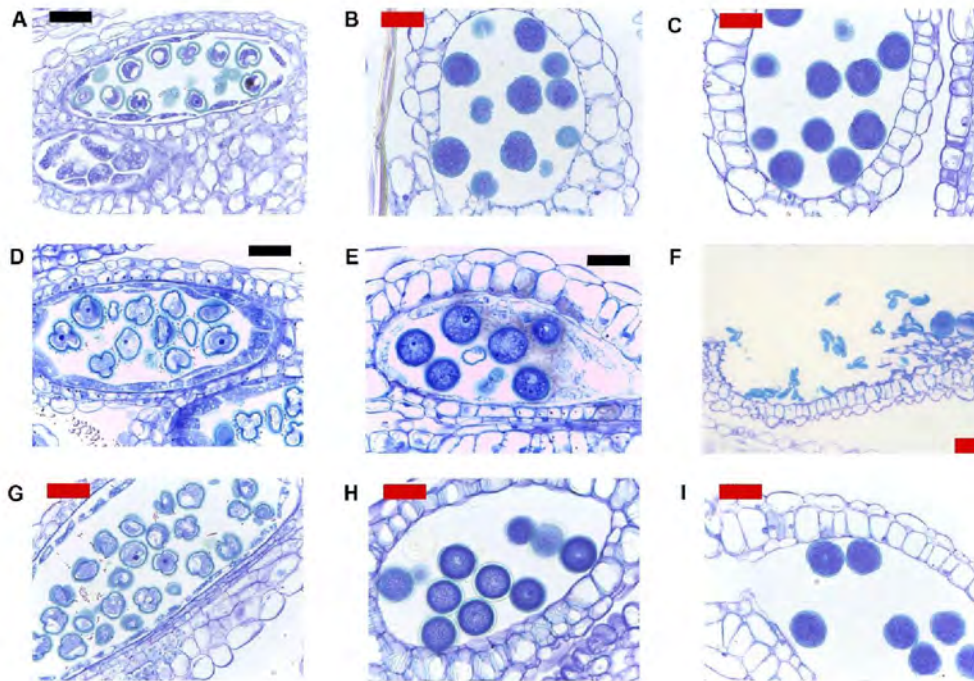


Figura 10. Cortes donde se muestra a los granos de polen en distintas fases del desarrollo de la flor. (A, B, C) pertenecen a WT; (D, E, F) corresponden a la mutante *bdx-1*; (G, H, I) representan a las flores de ASBDX. A), D) y G) en la fase temprana de las flores, los granos de polen se desarrollan normalmente tanto en ASBDX como en *bdx-1*; B) E) y H) en la flor completamente desarrollada antes de la polinización, algunos granos de polen en *bdx-1* muestran carencia de citoplasma y están completamente colapsados. La línea ASBDX muestra granos con citoplasma difuso. C, F, I) En el estadio donde la fecundación ya se realizó, los granos de polen maduros están listos para ser liberados en la WT y las líneas de *bdx-1* y ASBDX continúan mostrando granos de polen colapsados y con citoplasma difuso. Cortes de 1-2 μm , Tinción con azul de toluidina. Barra roja = 20 μm , Barra negra = 10 μm . n= 8-10 plantas para cada línea.

Con base en las alteraciones morfológicas del grano de polen, se profundizó en su funcionalidad con base en el porcentaje de germinación del tubo polínico, índice de la viabilidad del polen. Los ensayos *in vitro* de germinación del tubo polínico mostraron que hay una disminución en el porcentaje de granos de polen germinados tanto en la mutante *bdx-1* como la ASBDX con respecto a la WT. Las dos líneas mutante y transgénica presentaron un 15% de germinación, significativamente menor al porcentaje del polen germinado de las plantas WT, que fue de alrededor de un 58% (Fig. 11A), porcentaje menor pero representativo con lo descrito en la literatura para *Arabidopsis* (Fan *et al.*, 2001).

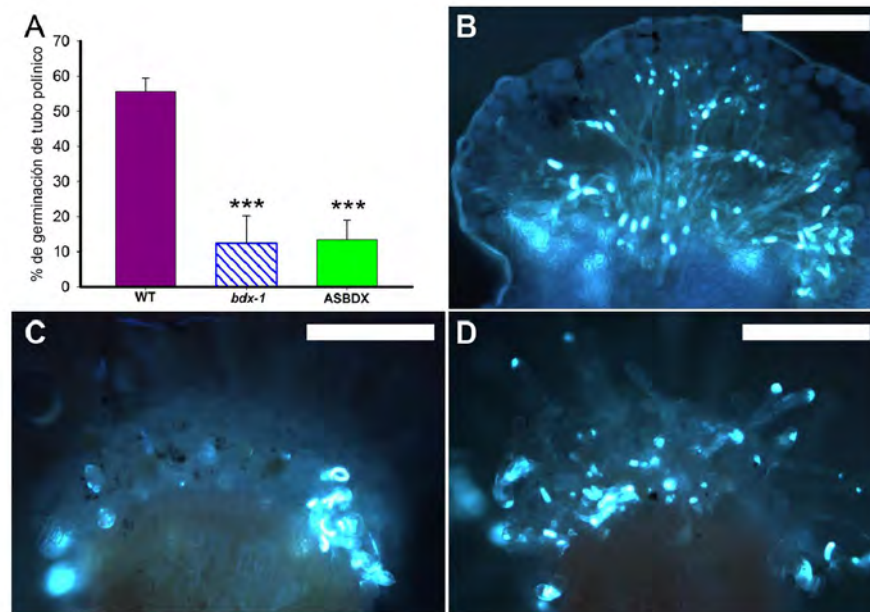


Figura 11. Viabilidad de los granos de polen en las líneas de menor expresión de *BDX*. A) Porcentaje de granos de polen germinados. *bdx-1* y ASBDX tienen un porcentaje menor con respecto a la línea silvestre (WT col. y *bdx-1* n=200, ASBDX n=100). Cada barra corresponde al promedio y desviación estándar de cuatro réplicas biológicas. ANOVA de una vía ($P < 0.05$). Granos de polen germinando en plantas B) WT C) *bdx-1* y D) ASBDX. La fluorescencia de la calosa sugiere la cantidad de granos de polen germinados. Barra blanca = 100 μm . Squash con azul de anilina.

Para corroborar si este fenómeno se repite en condiciones *in vivo*, se polinizaron flores WT, *bdx-1* y ASBDX, con granos de polen procedentes de flores de su mismo grupo experimental. Observaciones preliminares a la hora y tres horas post polinización, muestran que las flores *bdx-1* y ASBDX presentan menos tubos polínicos elongando sobre la papila estigmática con respecto a las WT al observarse aparentemente menor número de tapones de calosa en los tubos polínicos que se encuentran en desarrollo (Fig. 11 B, C, D).

Por otra parte, para establecer si los óvulos en la mutante *bdx-1* pudieran ser una estructura con alguna alteración morfológica relacionada directamente con la menor producción de semillas, se elaboraron análisis histológicos de estas estructuras. En el desarrollo de los óvulos, no se observaron diferencias notorias en todas las fases del desarrollo analizadas (Fig.12). Los óvulos se forman normalmente y tienen en su interior sacos embrionarios similares a los óvulos WT, sugiriendo así que los óvulos se desarrollan normalmente.

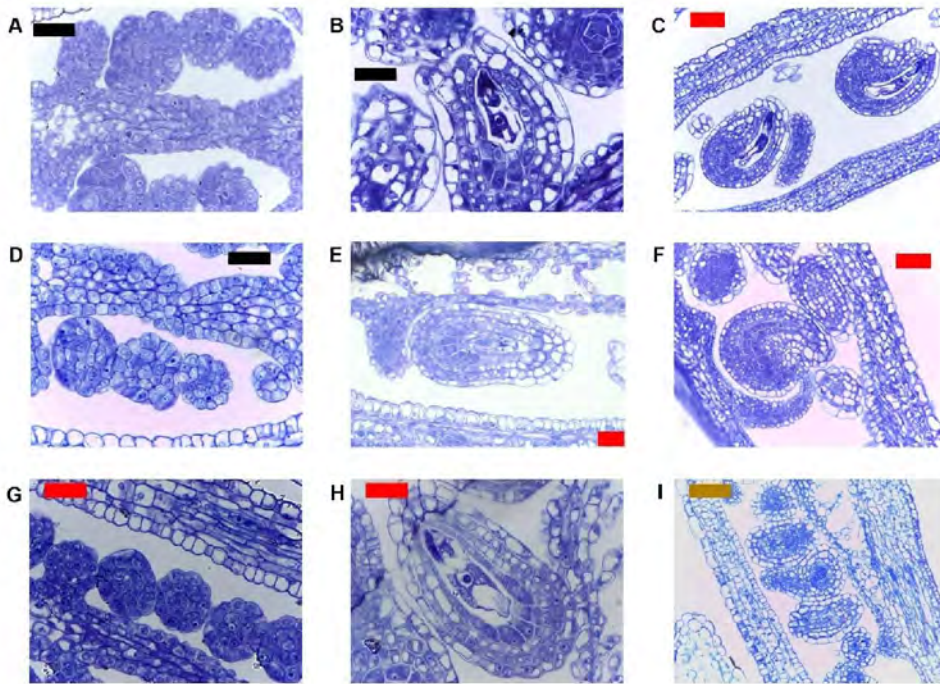


Figura 12. Cortes que muestran el desarrollo del óvulo en distintas fases del desarrollo de la flor. (A, B, C) pertenecen a WT; (D, E, F) corresponden a la mutante *bdx-1*; (G, H, I) representan a las flores de ASBDX. A), D) y G) muestran que, en las fases tempranas, los óvulos se desarrollan en apariencia normalmente. B), E) y H) en las flores completamente desarrolladas, los óvulos están correctamente desarrollados. C), F), I) en el estadio dónde la fecundación ya se realizó, los óvulos son normales en las tres líneas. Cortes de 1-2 μm , Tinción con azul de toluidina Barra roja = 20 μm , Barra negra = 10 μm , Barra dorada = 50 μm . n= 8-10 plantas para cada línea.

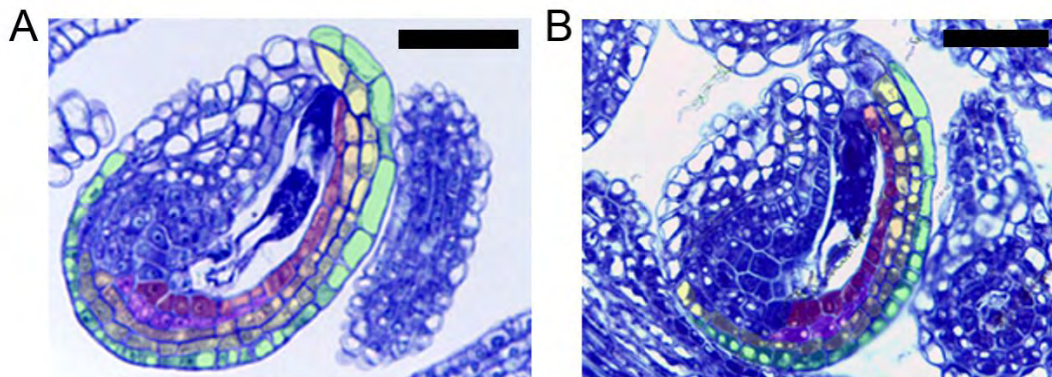


Figura 13. Cortes que muestran el desarrollo del óvulo en la fase final de la megagametogénesis. (A) pertenece a la WT; (B) Corresponden a la mutante *bdx-1*. Ambos tegumentos son biestratificados. En verde (oi2) y en amarillo (oi1) las capas de tegumento externo y en naranja (ii2), rojo (ii1) y morado (ii1') las de tegumento interno. En *bdx-1*, se observan perfectamente desarrolladas al igual que en la WT. Cortes de 1-2 μm , Tinción con azul de toluidina. Barra negra = 20 μm

Los tegumentos externo e interno que son el origen de la cubierta seminal en la semilla, también se conforman normalmente en *bdx-1* con respecto a lo observado en la WT (Fig. 13). En las semillas WT y *bdx-1*, la diferenciación de los tegumentos de las células subepidérmicas concuerda con lo establecido. El tegumento externo conformado por dos capas de células (oi1) y (oi2) se observa alrededor del tegumento interno. Sus células son vacuoladas y grandes en las zonas micropilar y calazal y más pequeñas en la zona de curvatura. Por otra parte, el tegumento interno conformado por dos capas de células en la región micropilar (ii1) e (ii2) se modifican normalmente en la zona de curvatura volviéndose tres capas, congruente por lo descrito por Beeckman *et al.*, 2000 (Fig.13).

Con base en estos resultados, la malformación de los granos de polen en la línea mutante *bdx-1* y el bajo índice de elongación del tubo polínico tanto en *bdx-1* como en ASBDX, indica que hay esterilidad masculina parcial en las líneas con baja expresión de *BDX*, siendo probablemente una de las causas por las que se forman menos semillas. Por otra parte, los óvulos no tienen alteraciones en sus estructuras que pudieran estar implicadas en la fecundación por lo que la baja producción de semillas no parece estar relacionada con los gametos femeninos.

Considerando que las auxinas son relevantes en el desarrollo adecuado del grano de polen, se llevó a cabo una cruce de la línea *bdx-1* con la línea homocigota DR5-GFP para determinar el gradiente de auxinas en diferentes fases del desarrollo de la planta. Considerando la falta de fenotipo anormal en la raíz de las plántulas de *bdx-1*, se determinó el patrón de auxinas activas en esta región como un posible control. Las raíces de siete días de plántulas de *bdx-1* no mostraron alteraciones en el patrón de auxinas activas (Fig. 14).

Durante de desarrollo de la flor, los resultados muestran que desde los estadios más tempranos se puede observar que las anteras de *bdx-1* presentan una menor señal de GFP con respecto al grupo control DR5-GFP, indicando una menor acumulación de auxinas activas (Fig. 15). Por lo tanto, la aparente menor actividad de las auxinas dentro de las anteras en la línea de baja expresión *bdx-1*, puede ser una posible causante de la esterilidad parcial masculina.

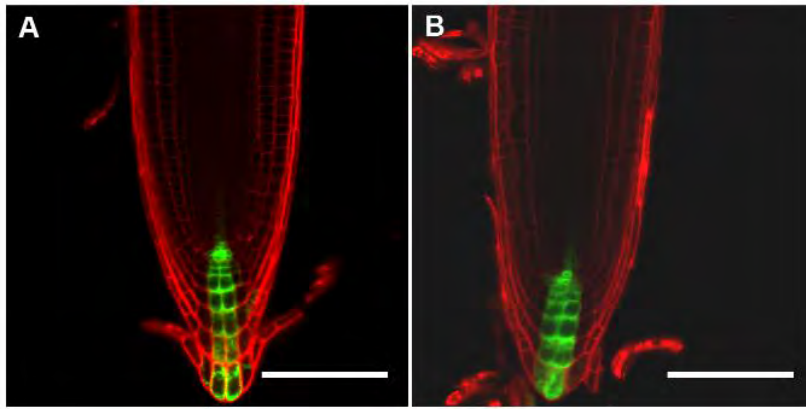


Figura 14. Raíces de plantas con el marcador DR5-GFP siete días posteriores a la siembra. En el panel A) el grupo control muestra presencia de la GFP en células del centro quiescente y la columela. En el panel B) la mutante de *bdx-1* presenta un patrón muy similar, descartando la participación de *BDX* en alguna alteración funcional en el gradiente de las auxinas al menos en esta etapa y zona del desarrollo de la planta. Barra blanca = 100 μm

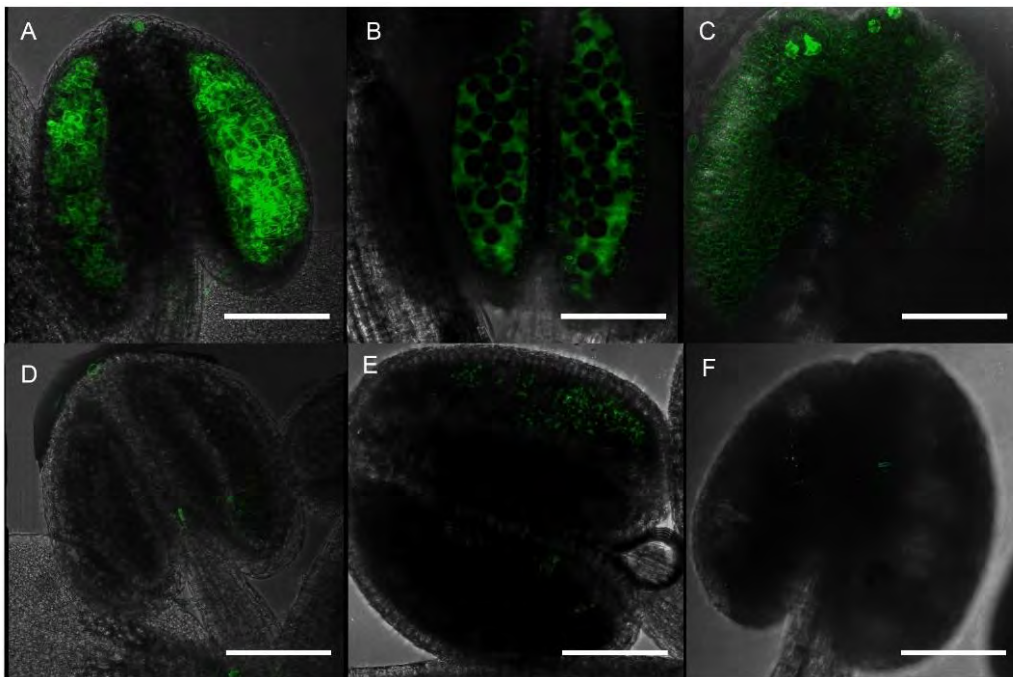


Figura 15. Marcador DR5-GFP en las anteras de tres distintas fases del desarrollo de la flor de *Arabidopsis*. A, B y C) En el control, el efecto de las auxinas a lo largo del desarrollo de la antera es intenso. D, E y F) En la mutante *bdx-1*, el marcador de auxinas activas se nota con menor intensidad. Barra blanca = 100 μm . n= 5-9 anteras de flores provenientes de plantas distintas

La esterilidad masculina en las plantas también está relacionada con un déficit nutricional. *BDX* es un gen que se expresa en el tejido vascular (Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014), y estudios preliminares han mostrado que las plantas ASBDX almacenan más almidón que las WT en las hojas de roseta después de 16 horas de oscuridad, sugiriendo

alteraciones en la movilización de sacarosa desde los órganos “fuente” hacia los órganos “demanda” de la planta (Zúñiga-Sánchez, 2015). En distintos trabajos se ha observado que tanto en las plantas sometidas a tratamientos de oscuridad prolongada que inducen el déficit nutricional en plantas WT (Lauxmann *et al.*, 2016), como en las líneas mutantes que tienen bajos niveles de carbohidratos solubles (Feike *et al.*, 2016), presentan una mayor expresión de los genes llamados de “inanición”, los cuales están relacionados generalmente con la inducción de movilización de lípidos o degradación de proteínas; eventos relacionados y temporalmente siguientes a la baja de carbohidratos disponibles o almidón en las plantas.

Algunos genes de inanición, por ejemplo, codifican para proteínas relacionadas con la proteólisis, vía el complejo 26S del proteosoma, que también puede ser inducida por diferentes tipos de estrés. La enzima con dominio de dedos de zinc ATL8 está relacionada con la ubiquitinación de proteínas en distintas vías de señalización (Serrano *et al.*, 2006). Y *KMD4/KFB50* que codifica para una proteína con dominio F-box llamada KISS ME DEADLY4 ha sido relacionada con la regulación de la ruta del ácido shikímico y la señalización de citocininas.

Con base en los antecedentes de Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014 y Zúñiga-Sánchez, 2015, además de los resultados obtenidos en las plantas de baja expresión de *BDX* en este trabajo, se decidió determinar los niveles de expresión de *ATL8* y *KMD4* en la línea *bdx-1* y compararlo contra la expresión basal de la WT. Se utilizaron inflorescencias y hojas de roseta, tejidos de órganos en *Arabidopsis* que muestran más claramente los síntomas de inanición.

En resultados preliminares, no existieron diferencias en la expresión de *ATL8* y *KMD4* en las plantas *bdx-1* crecidas 8 semanas en condiciones normales de fotoperiodo con respecto a las WT (Fig.16 A y B). Para demostrar que el sistema de inducción en la expresión génica de estos genes funcionaba adecuadamente, las líneas *bdx-1* y WT fueron sometidas a un tratamiento de doce horas de oscuridad donde se analizó nuevamente la expresión de los genes de inanición. Se detectó que estos genes incrementaron su expresión en las plantas sometidas al tratamiento de oscuridad extendida en ambas líneas (Fig. 16C y D). Sin embargo, en las plantas *bdx-1* la inducción en la expresión de *ATL8* y *KMD4* fue menor que el visto en la línea WT.

Los resultados obtenidos indican que las plantas *bdx-1* no se encuentran en déficit nutricional, ya que el incremento en la expresión de estos genes no fue mayor al observado en la WT, como ha sido reportado para otras mutantes crecidas en condiciones de crecimiento normales y con déficit nutricional demostrado. Sin embargo, no se puede descartar totalmente al déficit nutricional como una posible causa que pudiera estar participando en la esterilidad parcial masculina de las líneas de baja expresión de *BDX*, por lo que se necesitan realizar más experimentos como, por ejemplo, la cuantificación de azúcares disponibles y almidón en distintos órganos de la planta, para demostrar que la cantidad de nutrientes estén disminuidos o menos disponibles en las plantas de baja expresión de *BDX*.

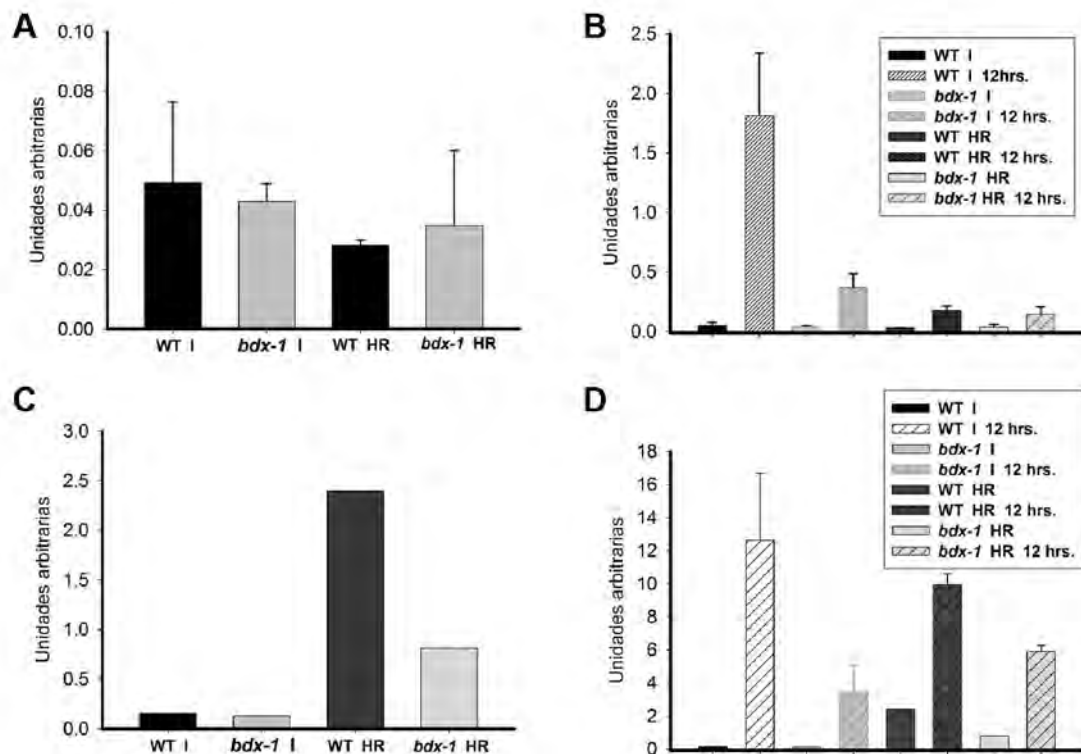


Figura 16. Ensayos preliminares de expresión de los genes marcadores de inanición *ATL8* y *KMD4* en inflorescencias y hojas de roseta de plantas de la línea *bdx-1* y WT. A) Expresión del gen *ATL8* en condiciones de crecimiento normales. n=3. B) Inducción de la expresión de *ATL8* en plantas sometidas a doce horas de oscuridad n=3. C) Expresión del gen *KMD4* en condiciones de crecimiento normales n=1. D) Inducción de la expresión de *KMD4* en plantas sometidas a doce horas de oscuridad n = 3. (I) inflorescencia; (HR) hojas de roseta. Barra de error representa la desviación estándar.

El análisis de los fenotipos de las plantas *bdx-1* y ASBDX en comparación con la WT no mostró diferencias a lo largo del desarrollo excepto por las descritas por Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014 relacionadas con el tamaño de la silicua y número de las semillas producidas. Solamente en resultados preliminares de este trabajo se sugiere una pérdida en la dominancia apical al menos de la línea ASBDX con respecto a la WT en la fase de madurez completa de las plantas (Fig.17), al tener más escapos en mediciones tomadas en condiciones de fotoperiodo largo y en luz continua.

La pérdida de la dominancia apical en las plantas está relacionada con cambios en la distribución y acumulación de las auxinas, evento que también podría explicar el grado de esterilidad parcial que presentan las líneas de baja expresión de *BDX*. La importancia de las auxinas en el desarrollo del grano de polen ha sido descrita ampliamente en gran variedad de trabajos, por lo cual, una menor acumulación de auxinas activas en las anteras explicaría la alteración del desarrollo de algunos de los granos de polen en *bdx-1* y muy posiblemente en ASBDX.

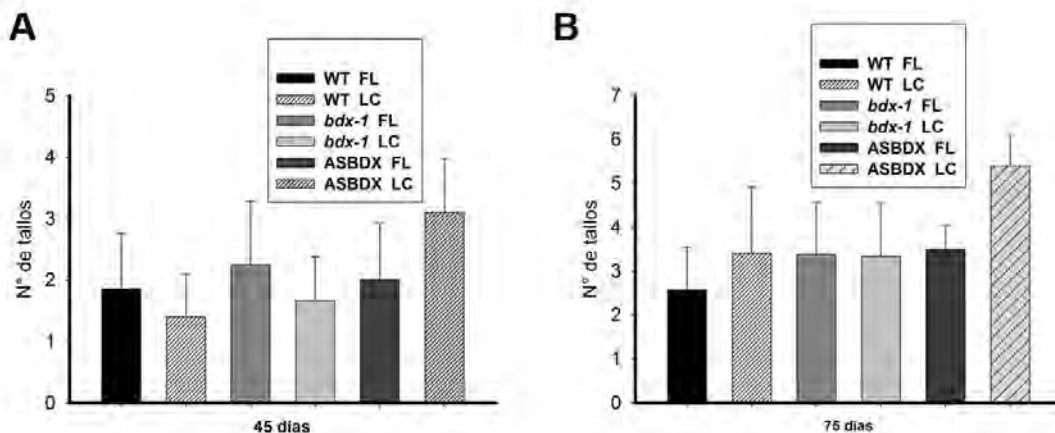


Figura 17. Número de tallos generados desde la roseta de las plantas de *Arabidopsis*. A) 45 días después de la siembra. B) 70-80 días de la siembra. Las líneas *bdx-1* y ASBDX tienen una tendencia a generar más tallos que las plantas WT siendo la línea ASBDX la que muestra mayor diferencia. (FL) fotoperiodo largo; (LC) luz continua. Barra de error representa la desviación estándar. n= 7-8

El hecho de que en los experimentos de Lauxmann *et al.*, 2016, el déficit nutricional está íntimamente relacionado con el movimiento de auxinas, demostrado con el cambio de polaridad del transportador PIN1 en células del SAM de plantas expuestas a un tratamiento de oscuridad prolongado, es otra evidencia que apoya no descartar la baja disponibilidad de nutrientes para las líneas de baja expresión de *BDX*.

Capítulo 2. Alteración de las semillas de *bdx-1* relacionada a la modificación en la arquitectura de la pared celular del endospermo y asociada a la desmetil esterificación de las pectinas.

En este capítulo se aborda como en *bdx-1*, una línea mutante que produce menor cantidad de semillas con respecto a la WT, se presentan además alteraciones morfológicas importantes en un porcentaje representativo del total de semillas producidas.

A lo largo del desarrollo de la semilla WT, las pectinas presentes en la pared celular del endospermo se encuentran desmetil esterificadas, específicamente en las zonas donde el embrión ejerce presión al elongarse. Posiblemente este mecanismo vuelva más laxo al endospermo y éste puede degradarse correctamente, permitiendo un plegamiento normal del embrión.

En *bdx-1* ésta desmetil esterificación no ocurre, propiciando posiblemente que el endospermo sea más rígido, y que esta rigidez altere la forma en la que el embrión se desarrolla, al estar sujeto a una restricción física más fuerte.

El artículo que forma parte de este capítulo es una evidencia adicional de la relación de la proteína BDX con la actividad de las pectin metil esterasas. Además, estos eventos pueden repercutir directamente en el establecimiento de las plántulas, al generar embriones con alteraciones morfológicas visibles.



Degree of pectin methyl esterification in endosperm cell walls is involved in embryo bending in *Arabidopsis thaliana*



José E. Cruz-Valderrama^a, Karina Jiménez-Durán^b, Esther Zúñiga-Sánchez^b, Alexis Salazar-Iribe^a, Judith Márquez-Guzmán^c, Alicia Gamboa-deBuen^{a,*}

^a Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP:04510, CDMX, Mexico

^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP:04510, CDMX, Mexico

^c Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP:04510, CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2017

Accepted 10 November 2017

Available online 12 November 2017

Keywords:

Arabidopsis

BIDXII (BDX, At4g32460)

Embryo

Endosperm

Homogalacturonans

ABSTRACT

The endosperm is a transitory structure involved in proper embryo elongation. The cell walls of mature seed endosperm are generally composed of a uniform distribution of cellulose, unesterified homogalacturonans, and arabinans. Recent studies suggest that changes in cell wall properties during endosperm development could be related to embryo growth. The degree of methyl esterification of homogalacturonans may be involved in this endosperm tissue remodelling. The relevance of the degree of homogalacturonan methyl esterification during seed development was determined by immunohistochemical analyses using a panel of probes with specificity for homogalacturonans with different degrees of methyl esterification. Low-esterified and un-esterified homogalacturonans were abundant in endosperm cells during embryo bending and were also detected in mature embryos. BIDXII (BDX) could be involved in seed development, because *bdx-1* mutants had misshapen embryos. The methyl esterification pattern described for WT seeds was different during *bdx-1* seed development; un-esterified homogalacturonans were scarcely present in the cell walls of endosperm in bending embryos and mature seeds. Our results suggested that the degree of methyl esterification of homogalacturonans in the endosperm cell wall may be involved in proper embryo development.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In several plants, flower and fruit production involves the synchronous development of stamens and gynoecia for successful fertilization and, finally, the production of viable seeds. In angiosperms, synchronous development of seed compartments also plays a role in seed viability; this spatial and temporal coordination of embryo, endosperm and seed coat development is fundamental for proper seed maturity [1]. In *Arabidopsis thaliana*, the embryo size is strongly influenced by the endosperm [2].

Endosperm development has been described in *Arabidopsis* and cereal plants. Specifically, in *Arabidopsis*, there is an initial phase of rapid free nuclear divisions that result in the formation of a coenocytic endosperm and subsequent cellularization that begins during the globular embryo state. Endosperm cellularization is initiated in the micropylar zone surrounding the developing

embryo and progresses towards the chalazal pole of the seed [3]. During this early stage, the endosperm is involved in driving the expansion of the seed coat [4]. Subsequently, the endosperm cell tissue is remodelled around the rapidly expanding embryo, and finally, only a single cell layer surrounds the mature embryo. This loss of endosperm cells could be dependent on alterations in the biochemical and physical properties of endosperm cell walls, which permit the growing embryo to expand and exert physical stresses on endosperm cells. The development of an embryo sheath that is rich in extensins has recently been established during the torpedo stage. This cuticle covers the embryo originating from the endosperm tissue, thereby avoiding endosperm adhesion to the embryo [5].

In *Arabidopsis*, the endosperm cell wall is mainly composed of the same polysaccharides found in other tissues. However, callose is still present in endosperm cell walls, and the side chains of xyloglucans (XG) lack terminal fucose residues [6]. The importance of this characteristic in seed development has not yet been determined, because no seed phenotypes have been described for the

* Corresponding author.

E-mail address: agamboa@ecologia.unam.mx (A. Gamboa-deBuen).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.077>

0006-291X/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

mur2 and *axy8* mutants, with decreased or increased fucosyltransferase and fucosidase fucosylation, respectively [7,8]. The cell walls of the mature seed endosperm are generally composed of a uniform distribution of cellulose, unesterified homogalacturonans (HG), and arabinans [9].

Recent studies suggest that changes in cell wall properties during endosperm development are related to embryo growth. The endosperm-specific basic helix-loop-helix transcription factor ZHOUP1 (ZOU) is involved in endosperm development. In *zou* mutants, the cell wall of endosperm cells is more robust; endosperm breakdown does not occur, and the size of the embryo is affected. The maintenance of (1–5)- α -L-arabinan epitopes, which are associated with rhamnogalacturonan-1 pectins, during endosperm breakdown in *zou* mutant seeds suggests that ZOU regulates the expression of pectin-modifying enzymes involved in endosperm cell wall breakdown [10]. ZOU also regulates the expression of *KERBEROS* (*KRS*), a gene that encodes a cysteine-rich peptide of the STIG1 family, which is strictly expressed in the endosperm and can be secreted into the apoplast. Among all *krs-1* seeds, 3% are misshapen, owing to altered embryo bending. These seeds exhibit alterations in embryo sheath integrity. It has been proposed that the cell wall of the sheath may include a mucilaginous-related material to lubricate the surface of the embryo [5].

The degree of methyl esterification of homogalacturonans may also be involved in endosperm tissue remodelling. PME (pectin methyl esterase) encoded by *At1g23200* (*HIGHLY METHYL-ESTERIFIED SEEDS*, *HMS*) and *PMEI5* (pectin methyl esterase inhibitor 5) are directly involved in embryo and seed development. *hms-1* mutant seeds present small embryos with an irregular shape, whereas *PMEI5* OE seeds have larger embryos [11].

Previously, we have reported that the DUF642 cell wall protein BDXII (*At4g32460*, *BDX*) is involved in plant reproduction [12]. *BDX* is expressed mainly in the vascular tissues of roots, leaves and embryo provascular cells. However, biotic or abiotic stress promotes gene expression and cell wall protein localization in all cell types of the primary root [13]. During flower development, *BDX* is expressed in anthers and stigmatic papillae. In the seed, the *BDX* transcript is enriched in the micropylar endosperm [14]. T-DNA mutants (*bdx-1* and *bdx-2*) and an antisense transgenic line (*ASBDX*) show an important decrease in seed production and alterations in seed morphology. These plants also have short siliques and a low level of PME activity. The increase in PME activity in *BDX* overexpressing lines (*OEBDX*) during germination suggests an involvement of *BDX*, directly or indirectly, in PME activity regulation [12].

Although the participation of the cell wall and its components has been described in a great variety of processes throughout plant development [15,16], there is little information regarding the participation of cell wall remodelling in seed formation. In this study, we are interested in the possible role of the pectin esterification degree in embryo development by using different antibodies and comparing the seed development of *bdx-1* mutants with alterations in embryo morphology and WT. Here, we show how changes in the degree of methyl esterification of pectin located in the cell wall of the endosperm are related to proper embryo elongation and bending.

2. Materials and methods

2.1. Plant growth and treatments

Arabidopsis thaliana (Columbia ecotype, WT) and *bdx-1* plants were grown as previously described [12]. Briefly, the plants were grown in soil in pots or on Murashige and Skoog (MS) medium (pH 5.7) in Petri dishes under a long day photoperiod (16-h light/8-h

dark) or under continuous light at 21 °C in a chamber (E-15, Conviron, Manitoba, Canada). Seedling transplantation from Petri dishes to soil was performed when 3–4 leaves were present.

Genotyping of T-DNA line (Salk_142260): Homozygous line from *bdx-1*.

In continuous light conditions *bdx-1* seed germination was improved and it was possible to obtain the homozygous *bdx-1* line. Plants were analyzed using the T-DNA left border LBB1 and the R3460se1 primers previously described [12]. To obtain the homozygous line, three generations were analysed.

2.2. Seed measurement and morphology

Mature seeds from different lines were photographed with a high definition camera. ImageJ software was used to analyse seed length, which was defined as the distance between the micropillar and chalazal zones, and seed width, which was defined as the perpendicular trace of the length of the middle of seeds. *bdx-1* seeds exhibited two different morphologies in relation to the long/width ratio; normal seeds showed a similar ratio to that of WT, and misshapen seeds had a higher or lower ratio than that of WT.

2.3. Germination testing

Ripened seeds (3–6 months) were used for the germination analyses. The final percentage of germination was scored in WT and normal and misshapen *bdx-1* seeds as previously described [12]. Three independent biological experiments were performed.

2.4. Seed viability

For the seed viability analysis, 20 embryos from WT, normal *bdx-1*, and misshapen mature seeds were carefully removed and incubated for 24 h at 23 °C in 1% 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0, [17]). Three biological replicates were assessed.

2.5. Seedling survival measurements

Seedlings were transplanted as described, and after flowering, the survival of plants from different lines was recorded. Three independent biological experiments were performed.

2.6. Histological and immunohistochemical analyses

Seeds at different stages of development were fixed in 4% (v/v) formaldehyde in phosphate-buffered saline for 24 h, dehydrated in an ethanol series, and embedded in LR-White resin (London Resin Company) as described by Webb and Gunning (1990) [18]. Sections of 1 μ m were cut with a microtome RMC-MT990 and some were stained with toluidine blue. These sections were observed and photographed with an Olympus BX51 microscope. For immunohistochemistry analysis, sections were incubated with primary rabbit anti-JIM5 antibody (1:50), JIM7 (1:50) or LM19 (1:50) for 12 h at 4 °C. They were then incubated with goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 fluorochrome secondary antibody (1:50, Molecular Probes) for 4 h at room temperature. Negative controls were done at the same time without primary antibody but with the incubation with the second antibody. These analyses were performed on at least five seeds for each developmental stage for WT, normal *bdx-1* and misshapen *bdx-1* seeds.

2.7. Confocal microscopy

All sections were excited with a 473 laser and detected with a

490–525 nm filter by using an Olympus FV1000 Laser Confocal Scanning Microscope. The negative immunohistochemistry controls were used to subtract basal fluorescence (Supp. Fig. 1). This analysis was performed on at least five seeds for each developmental stage for WT, normal *bdx-1* and misshapen *bdx-1* seeds.

3. Results

3.1. Seed and embryo morphology is altered in *bdx-1* mutant

bdx-1 plants display short siliques with few seeds that are heterogeneous in terms of size and morphology. Misshapen seeds had heterogeneous length/width ratios, with larger and smaller seeds than WT, whereas normal seeds were larger than WT seeds (Supp. Fig. 2A). The percentage of misshapen seed germination was 67%; however, only half of the seedlings survived and some of them present morphology alterations (Supp. Fig. 3). The decrease in seedling survival was also observed in normal seeds. A short silique phenotype was observed in plants derived from either normal or misshapen seeds (Table 1).

A misshapen seed morphology may suggest altered embryo morphology and viability (Fig. 1). In addition to *bdx-1* seed size, heterogeneity was also observed in embryo size; embryos from normal seeds were larger than WT embryos, whereas the embryos from misshapen seeds had different sizes with bending alterations (Fig. 1A). Despite the bending alterations, 62.5% of these embryos were viable (Fig. 1A). Among the misshapen seeds, the percentages of germination and embryo viability were similar, thus indicating that the decrease in germination was directly related to embryo viability. To determine the relationship of these embryo alterations to other seed compartments, embryo development was assessed at different seed stages (Fig. 1). In *bdx-1*, no visible modifications of the endosperm and integuments were detected during the globular and heart stages (Supp. Fig. 4). After this stage, embryonic morphological and seed size alterations were visible (Fig. 1B, C and D). Especially, abnormal radical bending was observed in some mature *bdx-1* seeds (Fig. 1D).

3.2. Degree of homogalacturonan methyl esterification during WT and *bdx-1* seed development

In Arabidopsis, unesterified HG is an important component of the core architecture of endosperm tissue in mature seeds. To determine the relevance of the degree of HG methyl esterification during seed development, immunohistochemical analyses were performed using a panel of probes specific for HG with different degrees of methyl esterification (Figs. 2–4).

JIM7, which binds to highly methyl esterified epitopes of HG, was detected during the different stages of WT and *bdx-1* seed development (Fig. 2). In WT seeds, JIM7 bound weakly to the embryo and endosperm but JIM7 epitopes were more abundant in the seed coat (Fig. 2A–D). For *bdx-1* seeds, JIM7 epitopes were homogenous and abundant in all developmental stages of the embryo and seed coat (Fig. 2E–J). In contrast, JIM7 bound heterogeneously to cell wall from endosperm cells in sections with torpedo, bending and mature embryo stages. In misshapen seeds, there was an

abundant signal in the endosperm cells surrounding the embryo in torpedo and bending stages (Fig. 2G and I).

JIM5 antibodies, which mainly bind to low-esterified epitopes of HG, were detected during WT and *bdx-1* seed development (Fig. 3). In both lines, a weak signal was detected in all seed structures in heart stage (Fig. 3A and B). The JIM5 epitope was present in WT and *bdx-1* seed coat during the torpedo, bending and mature embryo stages (Fig. 3C–J). In WT seeds, JIM5 revealed heterogeneity of low-esterified HGs in the endosperm, especially during embryo bending. The strongest signal was observed in the endosperm surrounding the bending region (Fig. 3E). In *bdx-1* normal seeds, a weak signal was observed in endosperm cells (Fig. 3F). In *bdx-1* misshapen seeds, the endosperm cell wall showed a faint but heterogeneous signal during bending stage (Fig. 3G). JIM5 epitopes were in misshapen seeds, abundant and homogeneously distributed in the embryo in contrast to WT and *bdx-1* normal seeds, at the bending and mature stages (Fig. 3J). In mature seeds, the differences in the pattern distribution of JIM5 epitopes between WT and *bdx-1* seeds were also remarkable (Fig. 3H–J).

To clearly establish differences in the degree of esterified HGs during seed development between WT and *bdx-1* seeds, the LM19 epitope pattern was determined in longitudinal sections of bending and mature embryo. LM19 antibody binds strongly to un-esterified pectins. The cell walls of endosperm cells from WT seeds were strongly labelled during the bending and mature embryo stages (Fig. 4A and C). In contrast, LM19 epitopes were less abundant in *bdx-1* seeds during embryo bending and were scarcely detected in the endosperm at the mature embryo stage (Fig. 4B and D).

In summary, *in situ* cell wall epitope detection of three different degrees of HG esterification suggested the presence of differences in temporal and spatial patterns during seed development between WT and *bdx-1* misshapen seeds, particularly in the cell walls of endosperm cells. At the torpedo stage of WT seeds, both high and low-esterified HGs were homogeneously and scarcely detected. However, during WT embryo bending, there was an important increase in low-esterified and un-esterified HGs in endosperm cells that was also present in mature embryos. In contrast, in *bdx-1* bending and mature embryos, un-esterified HGs were not abundant in the cell wall of endosperm cells.

4. Discussion

Proper development of the embryo during seed development is a determinant of seedling establishment. Misshapen *bdx-1* seeds have lower percentages of germination and of seedling survival, which are directly related to embryo development (Fig. 1). The variability in embryo morphology was also described for *hms-1* seeds, a phenotype related to changes in pectin methyl esterification [11]. Although 60% of *bdx-1* seeds were “normal”, these seeds were larger than WT seeds (Supp. Fig. 1), as described for OEPMEIS [11]. The high variability in *bdx-1* embryo, seed and seedling morphology may have resulted from physical restrictions derived from the endosperm or seed coat during embryo development. In *bdx-1* seeds, the endosperm cellularization process was similar to WT seeds, which showed a normal gap between the embryo and endosperm, thus suggesting integrity of the embryo sheath despite a *bdx-1* seed phenotype similar to that of *krs-1* seeds (Fig. 1, [5]). However, at the torpedo stage, there were visible alterations in seed morphology (Fig. 1B).

The biochemical and physical properties of the different seed components are strictly and finely regulated to permit embryo expansion. Endosperm cell wall stiffness decreases during embryo elongation [10]. This process is particularly important for seeds with hooked embryos with cotyledons adjacent to the radicle, as observed for Arabidopsis seeds. Low-esterified HGs were

Table 1
Percentage of *bdx-1* seed germination and seedling survival.

	WT, Col.	normal <i>bdx-1</i>	misshapen <i>bdx-1</i>
Germination (%)	94.84 ± 2.62	92.24 ± 7.33	67.13 ± 6.33
Seedling survival (%)	86.66 ± 6.66	73.48 ± 15.07	54.06 ± 14.54
Short silique phenotype (%)	0	100	100

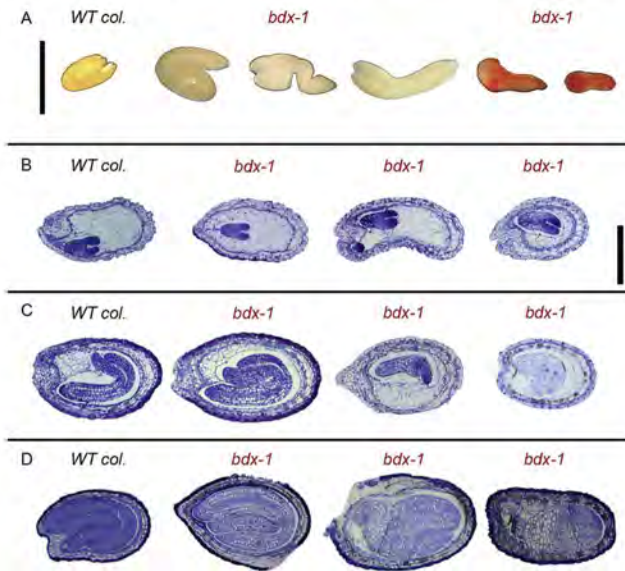


Fig. 1. Embryo morphology of *bdx-1* seeds at different developmental stages. A) WT embryo, *bdx-1* embryos of normal and misshapen seeds. Approximately sixty percent of *bdx-1* embryos from misshapen seeds were viable. Embryos were removed from ripened seeds imbibed for 1 h with water. Embryo viability was determined by the tetrazolium test. Black bar = 0.5 mm. B) Torpedo stage. C) Bending stage. D) Mature stage. Developing seeds from the different stages were included in the LR white. Slices (1 μ m) were stained with 1% toluidine blue. Bars = 250 μ m.

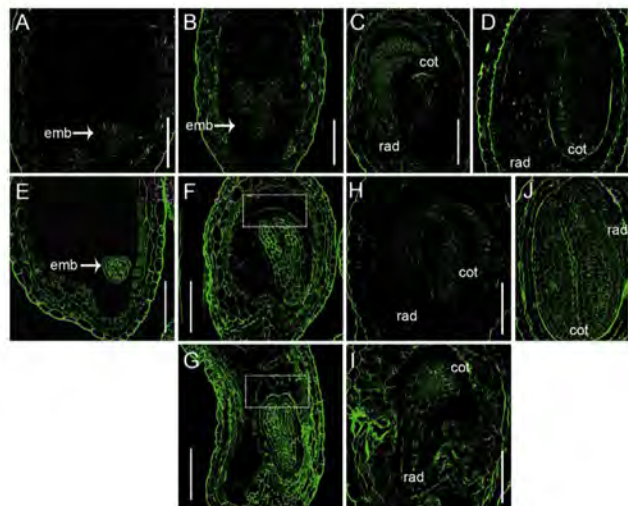


Fig. 2. *In situ* localization of high-esterified homogalacturonans by using the JIM7 antibody in medial longitudinal sections of WT and *bdx-1* seeds at different stages of development. A) WT Heart stage. B) WT Torpedo stage. C) WT elongated embryo during bending. D) WT Mature embryo. E) *bdx-1* Heart stage. F) Torpedo in *bdx-1* normal seed. G) Torpedo in *bdx-1* misshapen seed. H) Elongated embryo during bending in *bdx-1* normal seed. I) Elongated embryo during bending in *bdx-1* misshapen seed. J) Mature embryo in *bdx-1* normal seed. emb, embryo; cot, cotyledons; rad, radicle. Bars = 100 μ m. White rectangles show the different signal intensity of the endosperm cell walls between normal and misshapen seeds.

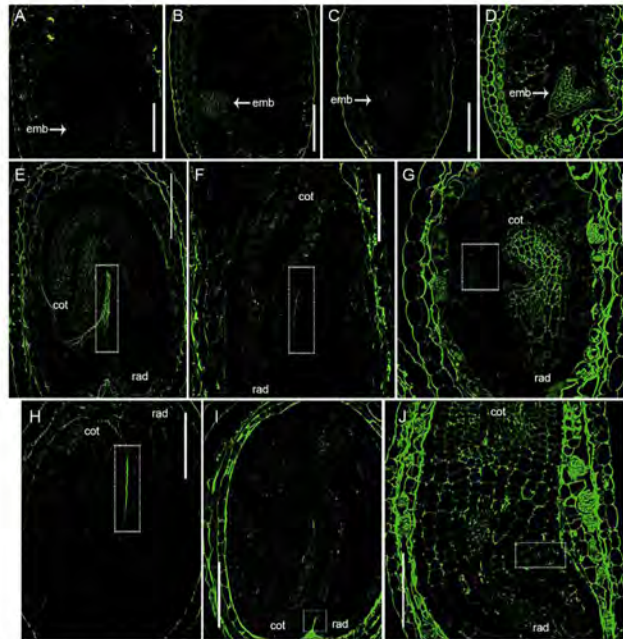


Fig. 3. *In situ* localization of low-esterified homogalacturonans by using the JIM5 antibody in medial longitudinal sections of WT and *bdx-1* seeds at different stages of development. A) WT heart stage. B) *bdx-1* heart stage. C) WT torpedo stage. D) *bdx-1* torpedo stage. E) WT elongated embryo during bending. F) Elongated embryo during bending in *bdx-1* normal seed. G) Elongated embryo during bending in *bdx-1* misshapen seeds. H) WT mature embryo. I) Mature embryo in *bdx-1* normal seed. J) Mature embryo in *bdx-1* misshapen seed. emb, embryo; cot, cotyledons; rad, radicle. Bars = 100 μ m. White rectangles show the different signal intensity of the endosperm cell walls between WT and *bdx-1* seeds.

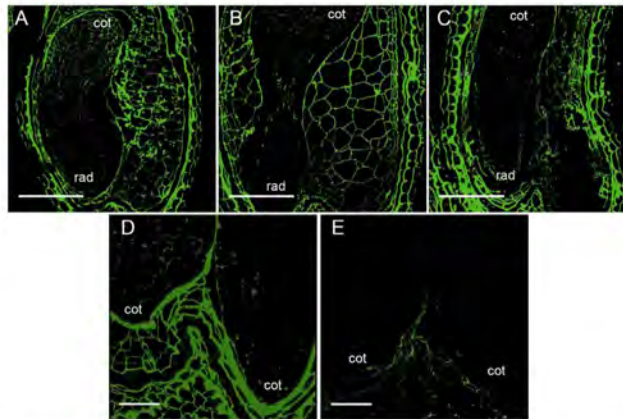


Fig. 4. *In situ* localization of non-esterified pectins by using the LM19 antibody in medial longitudinal sections of WT and *bdx-1* seeds at different stages of development. A) WT elongated embryo during bending. B) Elongated embryo during bending *bdx-1* normal seed. C) Elongated embryo in *bdx-1* misshapen seed D) WT mature embryo. E) Mature embryo from a *bdx-1* normal seed. emb, embryo; cot, cotyledons; rad, radicle. Bars: A–C = 100 μ m, D and E = 25 μ m.

abundantly detected in the endosperm located within cotyledons and radicle during WT embryo bending (Fig. 3E). Low-esterified HGs may be related either to an increase in cell wall relaxation or stiffness [16]. Given that the relaxation of endosperm cell walls is fundamental for proper embryo development, the decreased degree of HG esterification may be related to the cell wall relaxation process. The participation of low-esterified HGs in endosperm cell wall relaxation during embryo elongation was corroborated by using *bdx-1* seeds. As expected, during *bdx-1* embryo bending, the JIM5 epitope was weakly detected, thus indicating minor levels of low-esterified pectins in the endosperm, as compared with observations in WT embryos (Fig. 3E–G), and this difference was also observed in mature seeds (Fig. 3H–J). The JIM7 epitope was detected abundantly in *bdx-1* seeds, as previously described for OEPME15 imbibed seeds [11]. At the torpedo stage, differences in high-esterified HGs were detected in endosperm cells with a normal shape, and misshapen seeds were also observed (Fig. 2B, F and G). This result confirmed that the cell wall properties of endosperm cells could affect embryo elongation from the torpedo stage onwards. The distinction between WT and *bdx-1* in the degree of pectin esterification was corroborated by using LM19, a more specific antibody to non-esterified HGs. As described for 3-h imbibed seeds, non-esterified HGs were abundant in the endosperm of mature seeds [9]. In *bdx-1*, very low levels of LM19 were bound to endosperm cell walls (Fig. 4). These results indicated that non-esterified HGs were less abundant in *bdx-1* seeds, thus suggesting that the alterations in morphology of the embryo might be related to the maintenance of endosperm cell wall stiffening during embryo elongation. These changes in the degree of esterified HGs in *bdx-1* seeds during development may be a consequence of the decrease in PME activity previously observed in different organs of the *bdx-1* line. The cell wall in *bdx-1* endosperm contains low levels of low-esterified pectins at the embryo expansion and bending stages during endosperm breakdown, thus physically affecting embryo development. We also demonstrated an increase in the testa rupture rate and in PME activity in germinating *OEBDX* seeds, thus suggesting that the changes in the mechanical properties of the different components of the seed may be related to the function of BDX [12]. BDX is a member of DUF642, a family of cell wall proteins involved in the alteration of HG esterification, possibly through modulation of pectin methyl esterase activity in different plants. In *Arabidopsis*, another member of the DUF642 family, TEB, is involved in hypocotyl elongation; *teb-1* has longer hypocotyls and a lower concentration of JIM5 epitopes in epidermal cell walls than WT hypocotyls [19]. Heterologous analyses have also demonstrated that DUF642 members from other plant species are involved in the modulation of pectin esterification. *AhDGR2* is an *Amaranthus* DUF642 gene that is highly expressed during abiotic stress conditions. Overexpression of *AhDGR2* in *Arabidopsis* differentially modulated the activity of pectin methyl esterases, with an increase in roots but a decrease in leaves. These changes in PME activity correlated with the abundance of low-esterified pectins in each organ. *Arabidopsis* seeds overexpressing *AhDGR2* show hypersensitivity to ABA and NaCl during germination [20]. An increase in PME activity has been observed in fruits, leaves, seedlings and shoot tips of tomato plants overexpressing the DUF642 gene *VqDUF642* from *Vitis quinqueangularis*. These plants are also resistant to the fungus *Botrytis cinerea* [21].

A low degree of pectin methyl esterification could contribute to the weakening of the endosperm and thereby facilitates embryo expansion. This is consistent with several observations demonstrating the involvement of the cell wall architecture of the endosperm in embryo development. Moreover, the endosperm cell wall is a dynamic structure that could be implicated as an upstream factor in the endosperm cell elimination [22]. Our results suggest

that pectin modification is involved in the controlled loss of endosperm cells during proper seed development.

Conflicts of interest

No conflicts of interest are declared.

Acknowledgments

This work is presented as a partial fulfilment towards José Erik Cruz Valderrama's doctoral degree in the programme "Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)". J. E. Cruz-Valderrama acknowledges the scholarship and financial support provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. 255175.

This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT UNAM) IN207915.

We thank Clara Esquivel Huesca, Mónica Karina Pérez Pacheco, and Blanca Hernández Bautista for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.077>.

References

- [1] G.C. Ingram, Family life at close quarters: communication and constraint in angiosperm seed development, *Protoplasma* 247 (2010) 195–214.
- [2] D. García, J.N. Fitz Gerald, F. Berger, Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 17 (2005) 52–60.
- [3] M.B. Sorensen, U. Mayer, W. Lukowitz, H. Robert, P. Chambrier, G. Jurgens, C. Somerville, L. Lepoint, F. Berger, Cellularisation in the endosperm of *Arabidopsis thaliana* is coupled to mitosis and shares multiple components with cytokinesis, *Development* 129 (2002) 5567–5576.
- [4] D. García, V. Saingery, P. Chambrier, U. Mayer, G. Jurgens, F. Berger, *Arabidopsis* haiku mutants reveal new controls of seed size by endosperm, *Plant Physiol.* 131 (2003) 1661–1670.
- [5] S. Moussu, N.M. Doll, S. Chamot, L. Brocard, A. Creff, C. Fourquin, T. Widiez, Z.L. Nimchuk, G. Ingram, ZHOUP1 and KERBEROS mediate embryo/endosperm separation by promoting the formation of an extracellular sheath at the embryo surface, *Plant Cell* 29 (2017) 1642–1656.
- [6] M. Otegui, I.A. Staehelin, Syncytial-type cell plates: a novel kind of cell plate involved in endosperm cellularization of *Arabidopsis*, *Plant Cell* 12 (2000) 933–947.
- [7] G.F. Vanzin, M. Madsen, N.C. Carpita, N.V. Ratkhe, K. Keegstra, W.D. Reiter, The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 3340–3345.
- [8] M. Gunt, I. Neumeitzler, F. Kraemer, A. de Souza, A. Schultink, M. Penz, W.S. York, M. Pauly, AXYS encodes an alpha-fucosidase, underscoring the importance of apoplastic metabolism on the fine structure of *Arabidopsis* cell wall polysaccharides, *Plant Cell* 23 (2011) 4025–4040.
- [9] K.J. Lee, B.J. Dekkers, T. Steinbrecher, C.T. Walsh, A. Bacic, L. Bentsink, G. Leubner-Metzger, J.P. Knox, Distinct cell wall architectures in seed endosperms in representatives of the Brassicaceae and Solanaceae, *Plant Physiol.* 160 (2012) 1551–1566.
- [10] C. Fourquin, L. Beauzamy, S. Chamot, A. Creff, J. Goodrich, A. Boudaoud, G. Ingram, Mechanical stress mediated by both endosperm softening and embryo growth underlies endosperm elimination in *Arabidopsis* seeds, *Development* 143 (2016) 3300–3305.
- [11] G. Levesque-Tremblay, K. Müller, S.D. Mansfield, G.W. Haughn, HIGHLY METHYL ESTERIFIED SEEDS is a pectin methyl esterase involved in embryo development, *Plant Physiol.* 167 (2015) 725–737.
- [12] E. Zuniga-Sanchez, D. Soriano, E. Martinez-Barajas, A. Orozco-Segovia, A. Gamba-deBuen, BIDD1, the At4g32460 DUF642 gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during *Arabidopsis thaliana* seed germination and plant development, *BMC Plant Biol.* 14 (2014) 338.
- [13] A. Salazar-Irbe, E. Zúñiga-Sánchez, E. Zavaleta-Mejía, A. Gamba-DeBuen, Cell wall localization of two DUF642 proteins, BIDD1 and TEEBE, during *Melodogyne incognita* early inoculation, *Plant Pathol. J.* (2017), <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.05.2017.0101>.
- [14] B.J. Dekkers, S. Pearce, R.P. van Bolsteren-Veldkamp, A. Marshall, P. Widiari, J. Gilbert, H.G. Drost, G.W. Bassel, K. Müller, J.R. King, A.T. Wood, I. Cross, M. Quint, N. Krasnogor, G. Leubner-Metzger, M.J. Holdsworth, L. Bentsink,

- Transcriptional dynamics of two seed compartments with opposing roles in *Arabidopsis* seed germination, *Plant Physiol.* 163 (2013) 205–215.
- [15] M. Sassi, J. Traas, When biochemistry meets mechanics: a systems view of growth control in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 28 (2015) 137–143.
- [16] A. Voxel, H. Hofte, Cell wall integrity signaling in plants: "To grow or not to grow that's the question", *Glycobiology* 26 (2016) 950–960.
- [17] I. Debeaujon, K.M. Leon-Kloosterziel, M. Koornneef, Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 122 (2000) 403–414.
- [18] M.C. Webb, B.E. Gunning, Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana* I. Megasporogenesis, including the microtubular cytoskeleton, *Sex. Plant Reprod.* 3 (1990) 244–256.
- [19] A. Salazar-Irbe, L.T. Agredano-Moreno, E. Zuniga-Sanchez, L.F. Jimenez-Garcia, A. Gamboa-deBuen, The cell wall DUF642 At2g41800 (TEB) protein is involved in hypocotyl cell elongation, *Plant Sci.* 253 (2016) 206–214.
- [20] P.A. Palmeros-Suarez, J.A. Massange-Sanchez, L. Sanchez-Segura, N.A. Martinez-Gallardo, E. Espitia Rangel, J.F. Gomez-Leyva, J.P. Delano-Frier, AhDGR2, an amaranth abiotic stress-induced DUF642 protein gene, modifies cell wall structure and composition and causes salt and ABA hyper-sensitivity in transgenic *Arabidopsis*, *Planta* 245 (2017) 623–640.
- [21] X. Xie, Y. Wang, VqDUF642, a gene isolated from the Chinese grape *Vitis quinquangularis*, is involved in berry development and pathogen resistance, *Planta* 244 (2016) 1075–1094.
- [22] G.C. Ingram, Dying to live: cell elimination as a developmental strategy in angiosperm seeds, *J. Exp. Bot.* 68 (2017) 785–796.

Supplemental Figures

Degree of pectin methyl esterification in endosperm cell walls is involved in embryo bending in *Arabidopsis thaliana*

Authors: José E. Cruz-Valderrama¹, Karina Jiménez-Durán², Esther Zúñiga-Sánchez², Alexis Salazar-Irbe¹, Judith Márquez-Guzmán³, and Alicia Gamboa-deBuen^{1*}

¹Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria CP. 04510, CDMX, México. ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria CP. 04510, CDMX, México. ³Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria CP. 04510, CDMX, México

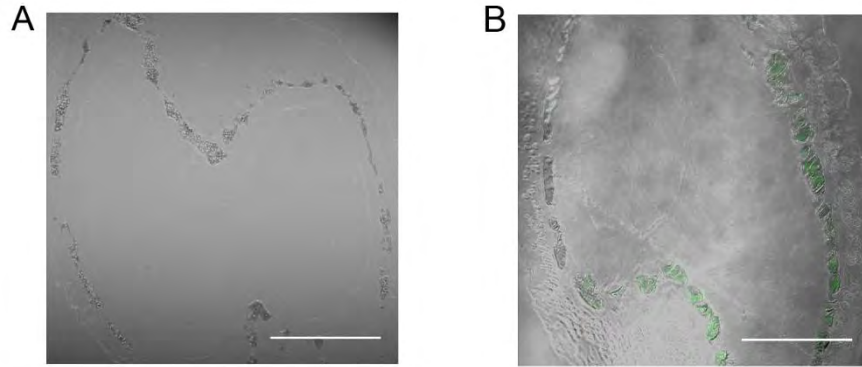
*Corresponding author

Alicia Gamboa-deBuen

Email: agamboa@ecologia.unam.mx

Tel: 52 55 56229008

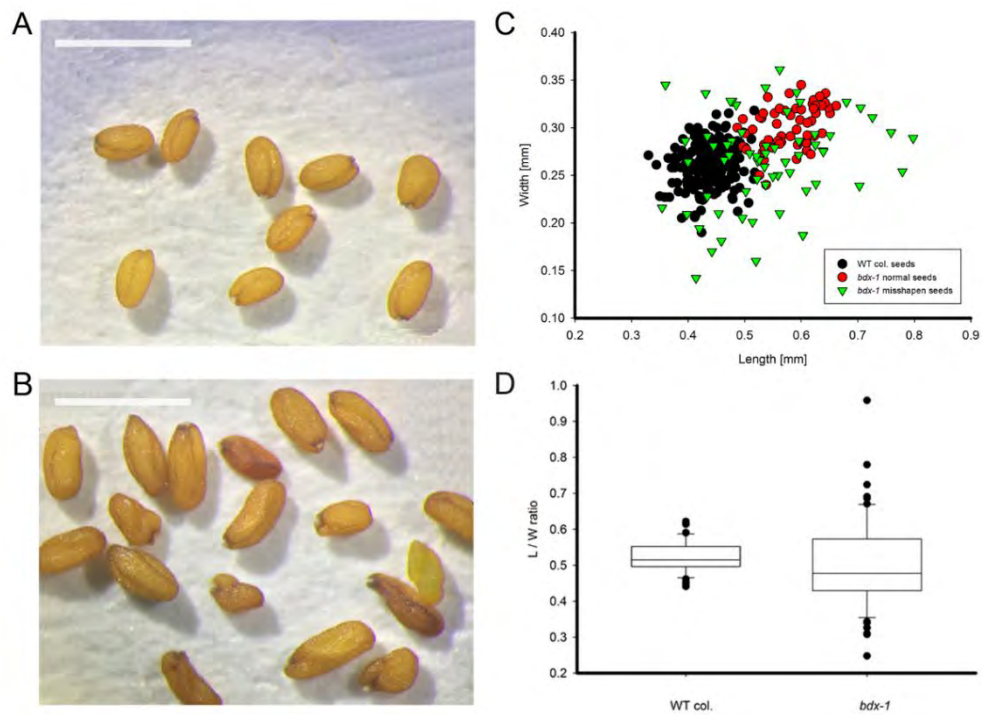
Fax: 52 55 56161976



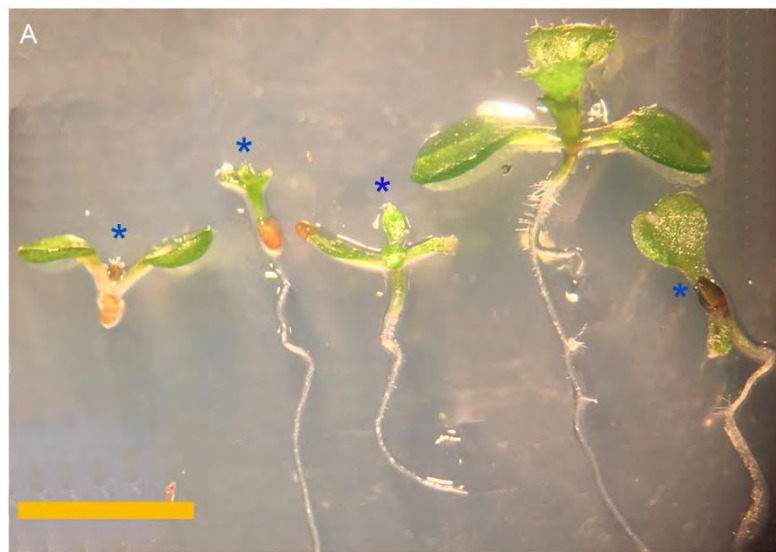
Supp. figure 1. Negative controls in seed from immunohistochemistry probe for homogalacturonan antibodies A) JIM5 and JIM7 negative slices for the secondary antibody B) LM19 negative slices for the secondary antibody. Bars = 100 μ m

To characterize the morphology of *bdx-1*, the seed length and width were measured. Figure 1 shows the distribution of the length/width ratio of WT and *bdx-1* seeds. The distribution of *bdx-1* seeds was consistent with the previously observed heterogeneity

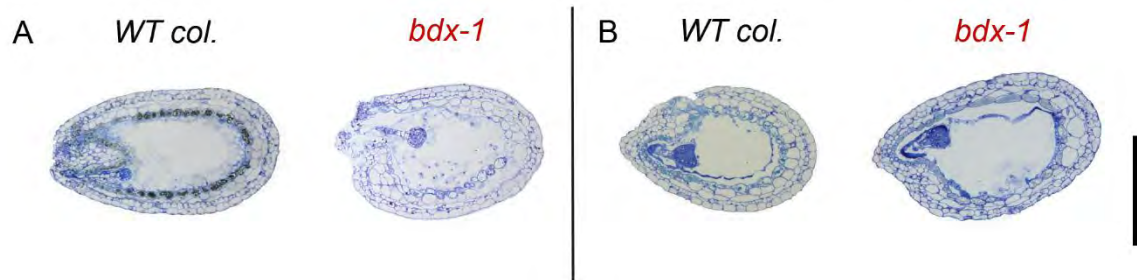
The altered seedling development observed in some seedlings from misshapen *bdx-1* seeds may explain the previously described low seedling survival performance (Table 1). Additionally, the general alterations in the radicles or cotyledons during embryo bending affected seedling growth and morphology. An absence of root development or a different expanding rate of cotyledons was observed in these seedlings. The viability of *bdx-1* normal embryos and seed germination was not affected, but there was a decrease in seedling survival despite the absence of alterations in seedling morphology.



Supp. figure 2. Morphological phenotype of *bdx-1* seeds under continuous light conditions. A) WT seeds. B) *bdx-1* seeds. C) Distribution of the length/width ratios of WT and *bdx-1* normal and *bdx-1* misshapen seeds. (D) Distribution of the length/width ratios of WT and *bdx-1* seeds. Bars = 0.5 mm.



Supp. figure 3. Morphological phenotype of *bdx-1* seedlings under continuous light conditions. Seedlings from misshapen seeds of *bdx-1* presenting altered development (*), but normal *bdx-1* seeds showed typical development.



Supp. figure 4. Embryo morphology of *bdx-1* seeds at different developmental stages. A) Globular stage. B) Heart stage. Developing seeds from the different stages were included in the LR white. Slices (1 μm) were stained with 1% toluidine blue. Bars = 250 μm .

Adicionalmente a la publicación, en las semillas de *bdx-1* se exploró si el embrión presentaba alguna alteración en la acumulación o distribución de las auxinas utilizando la cruza *bdx-1/DR5-GFP*, tal y como como fue reportado en el interior de las anteras (Fig. 15). La señal de GFP se detectó tanto en los embriones *bdx-1* como en los de WT en las etapas de torpedo temprano (Fig. 18 A, C) y en las etapas de torpedo tardío (Fig. 18 B, D) específicamente en la región del centro quiescente y la columela, además de la región apical de los cotiledones, tal como ha sido descrito en las diferentes etapas de desarrollo del embrión (Friml *et al.*, 2003) (Fig. 18), por lo que no se observó ningún cambio en la distribución o acumulación de auxinas en estas etapas del embrión.

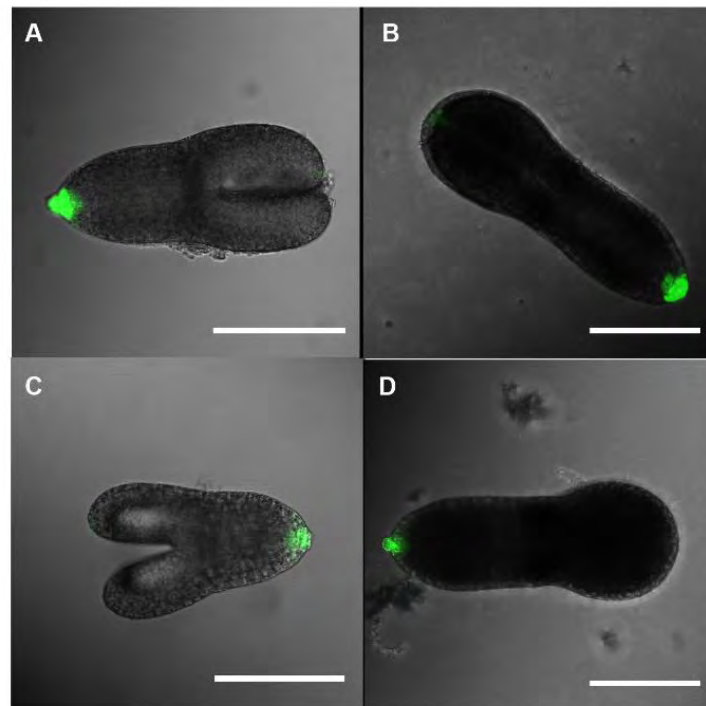


Figura 18. Presencia de auxinas activas en etapa de torpedo temprano del embrión en *Arabidopsis*. A) y C) y de torpedo tardío B) y D). En los paneles A) y B) se muestra al grupo control mientras que en C) y D) se muestran embriones de la mutante *bdx-1*. Se observa que no hay un cambio visible en el patrón de la GFP, variando ocasionalmente la intensidad del mismo. Barra blanca = 100 μm n=4.

Además, se determinó la presencia de la GFP en un microscopio de epifluorescencia en las silicuas y semillas completas. Las auxinas se detectaron principalmente en el funículo y en la semilla completa en las plantas WT. De manera general, en la semilla *bdx-1* la fluorescencia fue menor, y en las mismas regiones con respecto a las semillas WT (Fig. 19). Dado que en el embrión casi maduro de la línea *bdx-1*, la distribución y acumulación de auxinas fue el mismo que el control, se sugiere que el endospermo y la cubierta seminal son las estructuras que pueden presentar la diferencia en la menor detección de auxinas

activas y que éstas pudieran estar interviniendo en el desarrollo y maduración de la semilla, evento que podría relacionarse con la alteración física de las paredes del endospermo, retomando los resultados descritos en la publicación.

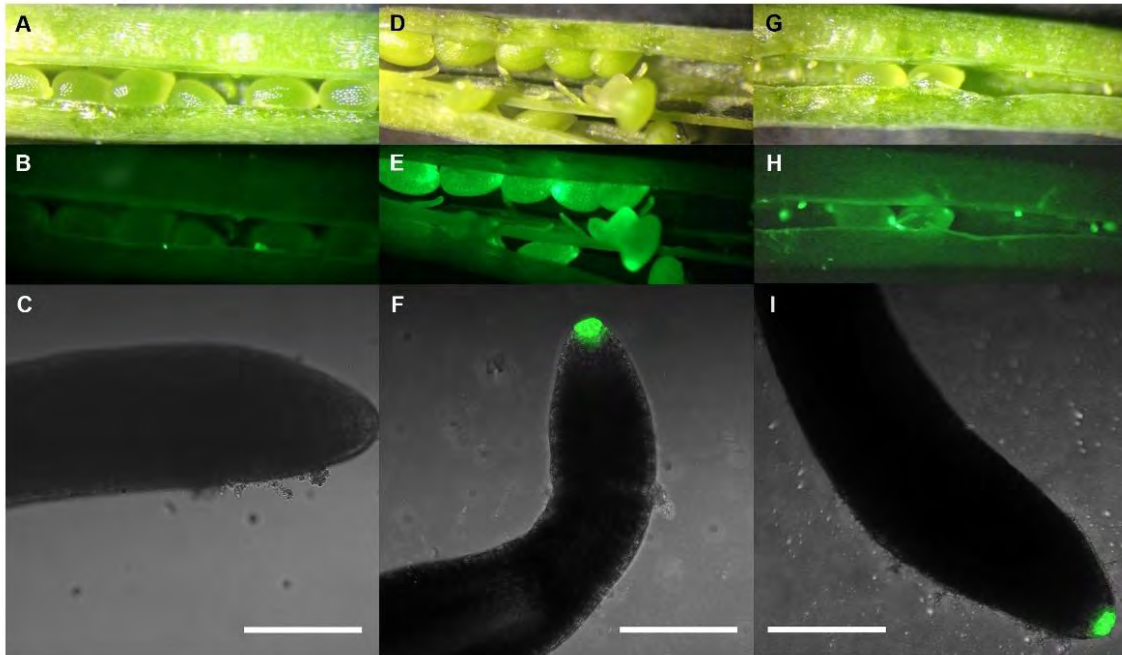


Figura 19. Concentración y distribución de auxinas en silicuas, semillas y embriones de la mutante *bdx-1*. A), B) y C) son los controles WT sin fluorescencia. D, E, F) pertenecen a la planta DR5-GFP control; G), H) e I), pertenecen a línea *bdx-1*. E) Se muestra que la acumulación de auxinas se distribuye en la zona cercana al funículo y no se puede hacer distinción de alguna zona específica en la semilla completa. H) La detección de auxinas en la semilla mutante *bdx-1* es menor con respecto al control. I) En el embrión, la detección de auxinas en la radícula es idéntica que en el control DR5-GFP (F). Barra blanca = 100 μm n = 3

Se conoce que la alteración en el flujo de auxinas puede ser regulada por la arquitectura de la pared celular, específicamente por el grado de metil-esterificación de las pectinas. Nuestros resultados sugieren que las alteraciones en el plegamiento del embrión en las semillas de baja expresión de *BDX*, se deben al menos a cambios químicos en la pared celular del endospermo, relacionados probablemente a cambios en el flujo y concentración de auxinas que son independientes del embrión. Además, el probable aumento en la restricción física que ejerce el endospermo sobre el embrión al cambiar la rigidez de sus paredes celulares pudiera ser determinante en el desarrollo adecuado de las semillas.

Capítulo 3. Resultados adicionales. Participación de BDX en el crecimiento del hipocótilo a través de la desmetil esterificación de las pectinas y su relación con la distribución y acumulación de las auxinas.

Los resultados observados en los capítulos anteriores demuestran que BDX participa al menos indirectamente en el desarrollo apropiado de los granos de polen, probablemente relacionada con la distribución y acumulación de las auxinas dentro de las anteras.

En el capítulo final de este escrito, el uso del hipocótilo para evaluar la relación del grado de desmetil esterificación de las pectinas con la acumulación y distribución de las auxinas activas, podría corroborar como es que se efectúa este tipo de regulación. El artículo se encuentra sometido a revisión al momento de la impresión de esta tesis.

Dado que el hipocótilo es un órgano sencillo para el estudio de mecanismos relacionados al crecimiento celular, donde las alteraciones químicas de las paredes celulares pueden ser determinantes y, además, se conoce la distribución y concentraciones de las auxinas muy finamente; es un modelo idóneo para determinar cómo las DUF642 de pared celular pueden estar participando activamente en distintos procesos a lo largo del desarrollo de la planta.

Title: BIIDXI, a DUF642 cell wall protein, is involved in hypocotyl growth via auxin efflux

Authors: Alexis Salazar-Irbe^{1*}, José Erik Cruz-Valderrama^{1*}, Karina Jiménez-Durán², Ximena Gómez-Maqueo¹, Alicia Gamboa-deBuen¹.

¹Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria CP. 04510, México DF, México. ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria CP. 04510, México DF, México

*These authors contributed equally to this work

Corresponding author: Dr. A. Gamboa-deBuen

Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria CP. 04510, México DF, México.

Tel: 52 55 56229008

Fax: 52 55 56161976

Email: agamboa@ecologia.unam.mx

Summary

Auxin is involved in hypocotyl elongation in response to different environmental factors. BIIDX1 is a cell wall DUF642 protein that participates in the regulation of the degree of pectin-methylesterification of the cell wall in different tissues, including hypocotyls. In continuous light, *bdx-1* seedlings presented longer hypocotyls than those of the WT, meanwhile the *BIIDX1*-overexpressed hypocotyls were auxin resistance. Auxin accumulation was observed in epidermal cells from *bdx-1* hypocotyls, and the distribution pattern of PIN1 proteins was different. Moreover, the gravitropic response of *bdx-1*, a process highly dependent on auxin flux, was increased. In this study we determined that BIIDX1 is involved in hypocotyl elongation through the regulation of auxin flux.

Key words: auxin; DUF642 cell wall proteins; Hypocotyl elongation.

Abbreviations: *BDX*, *BIIDX1* (*At4g32460*); DMSO, dimethyl sulfoxide; DUF, domains of unknown function; GFP, green fluorescent protein; IAA, indole-acetic acid; MS, Murashige and Skoog medium; NPA, *N*-1 Naphthylphthalamic acid; OE, overexpression; *PIN*, *PIN-FORMED* gene; PME, pectin methyl esterase; RT-PCR. Reverse transcription-PCR; *TEB*, *TEEBE* (*At2g41800*); WT, wild type.

Introduction

The hypocotyl is usually used in studies of cell elongation processes because of the low rate of cell proliferation during the development of this organ. The hypocotyl of *Arabidopsis thaliana* has 20 epidermal cells from embryonic origin that elongate to maintain hypocotyl growth (Gendreau et al., 1997). The elongation process of the hypocotyl cells is highly dynamic and widely influenced by abiotic factors, such as light quality and temperature, under the control of different hormones (Collett et al., 2000).

Auxin is involved in hypocotyl elongation in response to different environmental factors. Although the addition of auxin induces cell elongation in isolated stem segments and coleoptiles (Kutschera and Niklas, 2007), exogenously applied auxin inhibits hypocotyl elongation of seedlings grown under controlled light and temperature (Collett et al., 2000). Auxin levels in seedlings grown in control conditions may be optimal for cell elongation and, therefore, the addition of auxin produces a concentration sufficiently high to inhibit cell elongation (Collett et al., 2000). During hypocotyl elongation, *de novo* synthesis of auxin occurs in the cotyledons, and auxin is then transported to the hypocotyl by the vascular tissue (de Wit et al., 2014). Polar auxin transport involvement in hypocotyl elongation under control conditions has been demonstrated using a polar auxin transport inhibitor, *N*-1-Naphthylphthalamic acid (NPA). This compound disrupts free indole-acetic acid (IAA) flux from the cotyledons to hypocotyls and inhibits hypocotyl elongation (Keuskamp et al., 2010; Tao et al., 2008).

The relevance of auxin transport in hypocotyl elongation has been described under shade and high temperature. These environmental conditions promote an increase in hypocotyl elongation due to an increase of free IAA level in the epidermal cells (de Wit et al., 2014; Yamada et al., 2009). In response to these stimuli, there is an increase in the synthesis of auxin in the cotyledons that is transported to the hypocotyl vascular tissue and, finally, reaches the epidermal cells to stimulate elongation; processes that are highly dependent on PIN transporter function (de Wit et al., 2014; Keuskamp et al., 2010; Petrasek and Friml, 2009; Procko et al., 2016; Tao et al., 2008). The mutant *pin3* does not respond to shade (Keuskamp et al., 2010), whereas overexpression of *PIN1* increases hypocotyl elongation in response to high temperatures (Jia et al., 2016).

Auxin transport is also involved in the gravitropic response that requires a differential elongation of the epidermal cells of the hypocotyl in the area close to the intersection with the cotyledons. Asymmetric distribution of auxin, a consequence of auxin transporter

polarization in this zone, is related to the gravitropic response. The PIN3 localization at the bottom side of the hypocotyl endodermal cells during gravistimulation could be involved in auxin distribution, which could be associated with the reduced gravitropic response observed in *pin3* hypocotyls (Rakusova et al., 2011). However, disruption of PIN1 localization results in an increase in the gravitropic response (Noh et al., 2003).

Recently, (Nakayama et al., 2012) suggested that the mechanical status of the cell wall could alter the abundance and the subcellular distribution of membrane proteins, including auxin transporters. In particular, PIN1 could be very sensitive to small changes because its rapid cycling between membrane and intracellular compartments. A loss of the polar distribution of PIN transporters has been described as a result of genetic or pharmacological interference with cellulose (Feraru et al., 2011). Also, the degree of pectin-methylesterification of the cell wall of the shoot meristem cells is involved in PIN1 polar localization (Braybrook and Peaucelle, 2013).

BIIDX1 (BDX) and TEEBE (TEB) are DUF642 cell wall proteins that participate in the regulation of the degree of pectin-methylesterification of the cell wall of different tissues, including hypocotyls (Salazar-Irribé et al., 2016; Vazquez-Lobo et al., 2012; Zuniga-Sanchez et al., 2014). In this study, we determined that BDX is involved in hypocotyl elongation through the regulation of auxin flux.

Materials and Methods

Growth conditions

For this study, the following lines were used: WT (col), *DR5-GFP*, *teb1*, *teb-2*, *pTEB::TEB-GFP* (*OETEB*) for *At2g41800* gene and *bdx-1*, *pBDX::BDX-GFP*, and *bdx-1/DR5-GFP* for *At4g32460* gene (Salazar-Irribé et al., 2016; Salazar-Irribé et al., 2017; Zuniga-Sanchez et al., 2014). Seedlings were grown in a CONVIRON growth chamber (Winnipeg, Canada) in long photoperiod conditions (16 h light/8 h dark) at 22°C. Seeds were sterilized with 70% ethanol for 5 min, followed by 1% SDS and a 15% hypochlorite solution for 10 min. Seeds were subsequently rinsed with sterilized water and grown vertically on Petri dishes with 0.5 X Murashige and Skoog (MS) basal medium (Duchefa) containing 1% sucrose and 0.6%

agar. Hypocotyl elongation was determined as described in (Salazar-Irbe et al., 2016), using ImageJ (FIJI) software.

Indole acetic acid (IAA) and 1-N-Naphthylphthalamic acid (NPA) treatments

Sterilized seeds from different lines were stratified at 4°C for 2 days and subsequently sown in Petri dishes with 0.5 X MS with 1% sucrose and the addition of 1 µM IAA (diluted in distilled water) or 2 µM NPA (diluted in DMSO). For control plants, the same quantity of DMSO was added to the medium. No effect of DMSO was observed in control conditions. IAA and NPA treatments did not affect the germination rate. The control and transgenic plants grew vertically in continuous light conditions at 20-22°C. The 2 mM IAA stock solution was prepared in 100% ethanol, and the 2 mM NPA (Sigma-Aldrich) stock solution was prepared in DMSO.

For *BDX* expression analyses, WT seedlings grown 6 days under continuous light conditions at 22 °C were transferred for 24 hours to MS with 1µM IAA.

Quantitative RT-PCR

cDNA samples from 100 ng of RNA of transgenic and WT seedlings were amplified with SYBR Green Master Mix using an Applied Biosystems StepOne platform (Applied Biosystems). PCR conditions were 50 °C for 2 min for DNA polymerase activation and 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C; finally, samples were subjected to 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 15 s at 95 °C for melting curve analysis. Three independent biological replicates with three technical replicates were performed using specific primers for *BDX* forward (5'-CTCTCGCTCACTCTTCTCCAA-3') and reverse (5'-CGACAAAGCCTGAGAGTTCCC-3'), and *ACT7* and *PDF* [Protein phosphatase 2A, (Lauxmann et al., 2016)] were used as endogenous controls. Expression analyses were performed using the $2^{-\Delta CT}$ method described by (Schmittgen and Livak, 2008). Student's t-tests were performed using R statistical software (Team., 2017).

Inmunohistochemistry analysis

Hypocotyl of WT and *bdx-1* 7-d seedlings of were fixed in 4% (v/v) formaldehyde in phosphate buffered saline for 24 h, dehydrated in an ethanol series, and embedded in LR-White resin (London Resin Company) as described by Webb and Gunning (1990). Sections of 1 µm were cut with a microtome RMC-MT990. For immunohistochemistry analysis, sections were incubated with primary goat anti-PIN1 antibody (1:100), rat anti-LM19

antibody (1:50) and rat anti-LM20 antibody for 12 h at 4 °C. They were then incubated with chicken anti-goat Alexa Fluor 488 fluorochrome secondary antibody (1:50, Molecular Probes) y goat anti-rat Alexa Fluor 488 fluorochrome secondary antibody (1:50, Molecular Probes) respectively for 4 h at room temperature. Negative controls were done at the same time without primary antibody but with the incubation with the second antibody. These analyses were performed on at least three seedlings for each biological replicate. All sections were excited with a 473 laser and detected with a 490-525 nm filter by using an Olympus FV1000 Laser Confocal Scanning Microscope. The negative immunohistochemistry controls were used to subtract basal fluorescence.

Gravitropic stimulation

For the gravitropism treatment, plates with 4-day-old seedlings grown vertically were turned 90° during one day. Then, the hypocotyl curvature was measured, with hypocotyl curvature defined as the angle formed between the growing direction of the apex and the horizontal base line. Angle measurements were performed on digital images using ImageJ software. Three replicates of at least 10 seedlings with a synchronized germination start were processed for all treatments.

Results and Discussion

Different hormones and environmental factors determine hypocotyl cell elongation. Auxin is one of the most studied hormones involved in hypocotyl elongation. In response to auxin, *TEB* expression increases (Salazar-Iribe et al., 2016); therefore, we studied the effect of auxin on *BDX* expression. As expected, *BDX* expression increased in auxin-treated seedlings (Figure 1A). To establish a relation between *BDX* and *TEB* function and auxin, during hypocotyl growth, we determined the effects of IAA and NPA on hypocotyl elongation of mutants and overexpressed transgenic seedlings growing under continuous light (Figure 1B and Supp. fig. 1). Compared with the WT, the hypocotyls of *bdx-1* seedlings were larger, whereas hypocotyls observed in *OEBDX* seedlings were smaller, as described for *TEB* lines (Salazar-Iribe et al., 2016). IAA treatment causes a decrease in hypocotyl elongation in WT seedlings according to (Collett et al., 2000). Seedlings of *OEBDX* and *OETEB* were resistant to IAA, and *bdx-1* and *teb-1* had a similar response to that of the WT. *bdx-1* and WT hypocotyl elongation was inhibited by auxin treatment 40% and 50%, respectively (Figure

1B; Supp. fig. 1). An auxin-resistant phenotype has been previously described in mutants involved in auxin signaling processes (Collett et al., 2000).

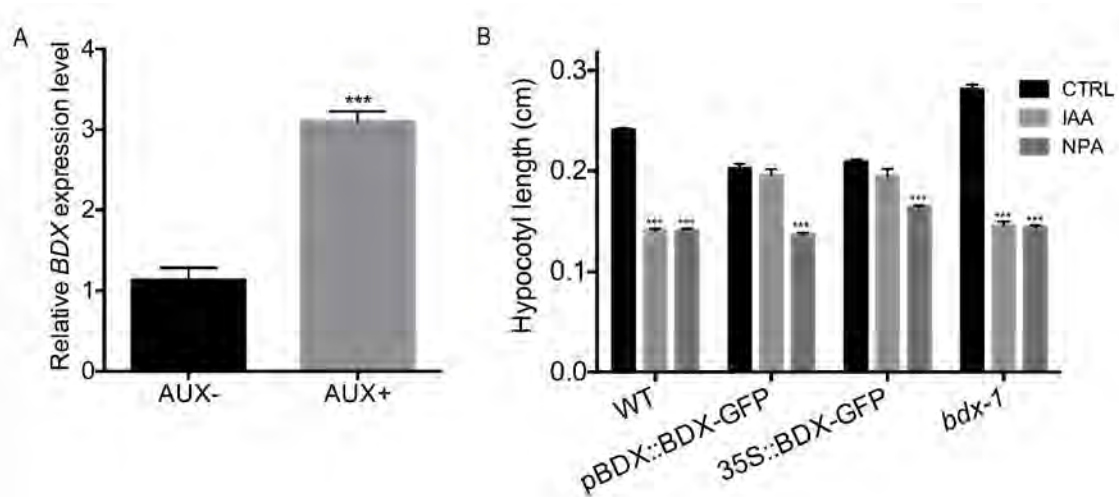


Figure 1. Effect of auxin on *BDX* expression and hypocotyl elongation of *BDX* overexpression and mutant lines. A) Auxin induction of *BDX* expression in 7-d-old seedlings. 6-d-old seedlings grown under continuous light conditions at 22 °C were transferred for 24 hours to MS with 1 μ M IAA. For qPCR analysis, *PDF* and *ACT7* primers were used as standards. Three biological replicates were performed. Statistical analysis was performed using a Student's t-test. B) Effect of IAA and NPA on hypocotyl length of WT, *pBDX::BDX-GFP*, *OEBDX* and *bdx-1*. Seeds were sown on MS and MS with IAA (1 μ M) or NPA (2 μ M), and 7-d-old hypocotyl length was determined. Three biological replicates were performed. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA ($P < 0.05$).

To determine whether the function of *BDX* in the hypocotyl is related to auxin, we studied auxin accumulation in the transgenic line *bdx-1/DR5-GFP* (Figure 2). In the hypocotyls from the WT seedlings (*DR5-GFP*), the fluorescence was detected exclusively in the vascular tissue, as previously described (Figure 2A and C; (Zheng et al., 2016)). No signal was detected in the vascular tissue of *bdx-1/DR5-GFP* hypocotyls, but the epidermal cells showed an important signal (Figure 2B and D). These results suggest that *BDX* affected

auxin distribution in hypocotyl tissues; the absence of *BDX* promoted auxin accumulation in epidermal cells and, concomitantly, hypocotyl elongation. Considering that *BDX* is a cell wall protein that could be involved in the regulation of the degree of methyl esterification, the localization of PIN1 in hypocotyls from WT and *bdx-1* seedlings was performed (Figure 2E and F). In medial longitudinal sections of WT hypocotyls, PIN1 was localized in the vascular tissue and the external membrane of epidermal cells, meanwhile in *bdx-1* hypocotyls PIN1 was also localized in the cortex cells. These results suggested that the *bdx-1* mutation altered the cycling velocity of PIN1 proteins.

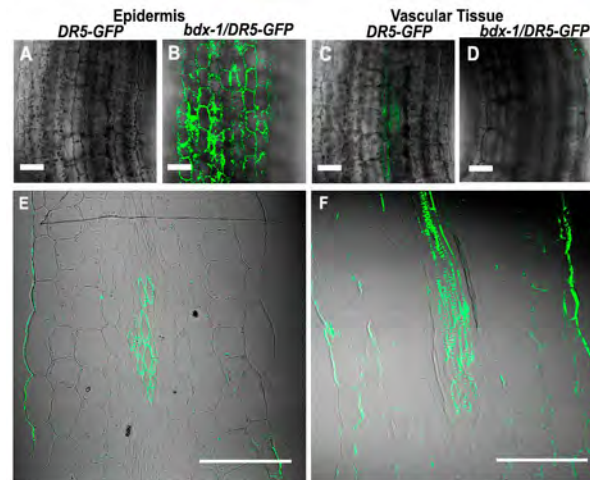


Figure 2. Auxin and PIN1 localization in hypocotyl cells from WT and *bdx-1* seedlings. (A) GFP detection on epidermal cells of *DR5* and (B) *bdx-1/DR5* hypocotyls from 7-d-old seedlings grown in MS. (C) GFP detection on vascular tissue of *DR5* and (D) *bdx-1/DR5* hypocotyls from 7-d-old seedlings grown in MS. (E) PIN1 localization was done using the anti-PIN1 antibody in medial longitudinal sections of hypocotyls. In WT hypocotyls from 7-d-old seedlings, PIN1 was localized in vascular tissue and epidermal cells (F) PIN1 localization in vascular tissue and epidermal and cortex cells in *bdx-1* hypocotyls from 7-d-old seedlings grown in MS. All images are section images; A-D) bars=50 μm, E, F) bars = 100 μm. Three biological replicates were performed and same results were obtained.

BDX is a cell wall protein that has been described in different cell wall proteomes, and is involved in the regulation of the degree of pectin methylesterification in the endosperm (Cruz-Valderrama et al., 2018). In order to determine if *BDX* is also involved in the regulation of the degree of pectin methylesterification during hypocotyls elongation, pectin methylesterification patterns were analyzed in WT and *bdx-1* hypocotyl cells (Figure 3).

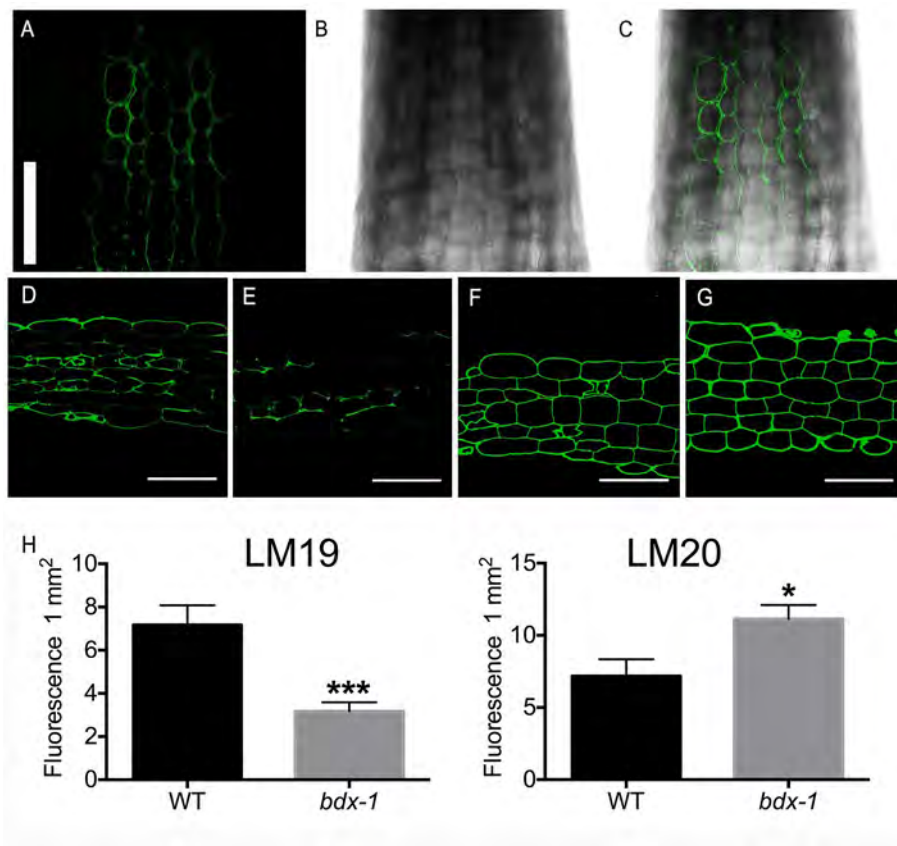


Figure 3. Cell wall localization of BDX and pectins in epidermal cells of hypocotyl. A-C) GFP detection on epidermal cells of *pBDX::BDX-GFP* hypocotyls from 7-d-old seedlings grown in MS. Demethyl- esterified pectins detected in WT (D) and *bdx-1* (E) epidermal cells from hypocotyls using LM19 antibody. Methyl- esterified pectins detected in WT (F) and *bdx-1* (G) epidermal cells from hypocotyls using LM20 antibody. Fluorescence was quantified by using the Image-J program for LM19 (H) and LM20 (I). Three biological replicates were performed. Statistical analysis was performed using a Student's t-test (*** $P < 0.001$, * $P < 0.05$).

As it was expected, BDX was localized in the cell wall of hypocotyl epidermal cells (Figure 3A-C) and the epidermal cells of *bdx-1* longer hypocotyls showed a decrease in demethylesterification of pectins (Figure 3D-E) (Salazar-Iribe et al., 2016). In general, a decrease of the de-methyl esterification of pectin is associated to reduced length (Hocq et al., 2017). However, there are several studies that support our results; PME overexpression reduced hypocotyl length of Arabidopsis seedlings (Derbyshire et al., 2007). Considering that *bdx-1* hypocotyls also showed a different pattern of PIN1 localization that could explain

auxin accumulation in the epidermal cells (Figure 2), and the involvement of the degree of methylesterification of pectins in PIN1 polar localization in the shoot apical meristem of *Arabidopsis* (Braybrook and Peaucelle, 2013), the increase in *bdx-1* hypocotyls length could be related to changes in auxin transport rather than the cell wall loosening process.

The role of the auxin and PIN1 in the gravitropism response has been widely studied. In *mdr* hypocotyls, with disrupted the localization of PIN1, the gravitropic response is more evident than that in WT hypocotyls (Jia et al., 2016; Noh et al., 2003). In *bdx-1* hypocotyls, that showed an increased response to gravitropism compared with that of the WT (Figure 4), alteration in auxin distribution via PIN1 could also be involved in this response.

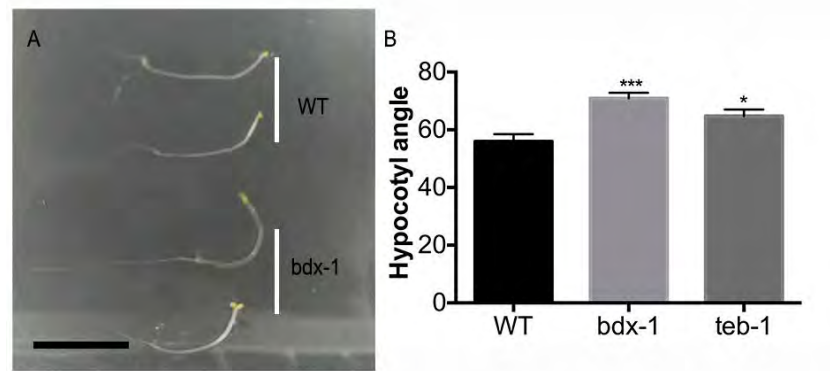


Figure 4. Gravitropic response of WT and *bdx-1* hypocotyls. (A) Seedlings were grown in the dark. After 5 days, the Petri dish was rotated 90° for 24 hours. (B) The hypocotyl angle was measured using image-J. Three biological replicates were performed. Statistical analysis was performed using a Student's t-test ($P < 0.05$). Black bar = 1 cm.

The relevance of the degree of pectin methylesterification in cell elongation via cell wall loosening has been well documented (Hocq et al., 2017). In this study we demonstrated that the degree of pectin methylesterification is also involved in auxin transport to determine cell elongation.

Acknowledgments

This work is presented as a partial fulfillment of JE Cruz Valderrama doctoral degree in the program “Posgrado de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)”. J. E. Cruz Valderrama was supported by the grant provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) no. 385278 and the financial support from Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México. A. Salazar-Irbe was supported by the scholarship provided by CONACyT no. 227932 and the financial support from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México.

Funding information

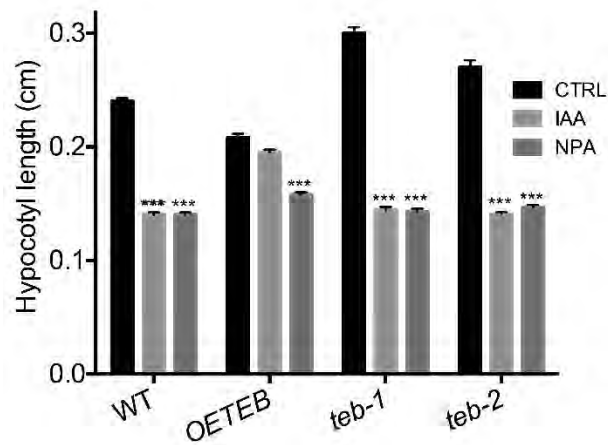
This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica [(PAPIIT UNAM) IN207915 to AGB]

References

- Braybrook, S.A., Peaucelle, A., 2013. Mechano-chemical aspects of organ formation in *Arabidopsis thaliana*: the relationship between auxin and pectin. *PLoS One* 8, e57813.
- Collett, C.E., Harberd, N.P., Leyser, O., 2000. Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *Plant Physiol* 124, 553-562.
- Cruz-Valderrama, J.E., Jiménez-Durán, K., Zúñiga-Sánchez, E., Salazar-Irbe, A., Márquez-Guzmán, J., Gamboa-deBuen, A., 2018. Degree of pectin methyl esterification in endosperm cell walls is involved in embryo bending in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 495, 639-645.
- de Wit, M., Lorrain, S., Fankhauser, C., 2014. Auxin-mediated plant architectural changes in response to shade and high temperature. *Physiol Plant* 151, 13-24.
- 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.
- Feraru, E., Feraru, M.I., Kleine-Vehn, J., Martiniere, A., Mouille, G., Vanneste, S., Vernhettes, S., Runions, J., Friml, J., 2011. PIN polarity maintenance by the cell wall in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 21, 338-343.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., Hofte, H., 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114, 295-305.
- Hocq, L., Pelloux, J., Lefebvre, V., 2017. Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth. *Trends Plant Sci* 22, 20-29.
- Jia, W., Li, B., Li, S., Liang, Y., Wu, X., Ma, M., Wang, J., Gao, J., Cai, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Li, J., Wang, Y., 2016. Mitogen-activated protein kinase cascade MKK7-MPK6 plays important roles in plant development and regulates shoot branching by phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 14, e1002550.

- Keuskamp, D.H., Pollmann, S., Voeselek, L.A., Peeters, A.J., Pierik, R., 2010. Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22740-22744.
- Kutschera, U., Niklas, K.J., 2007. The epidermal-growth-control theory of stem elongation: an old and a new perspective. *J Plant Physiol* 164, 1395-1409.
- Lauxmann, M.A., Annunziata, M.G., Brunoud, G., Wahl, V., Koczut, A., Burgos, A., Olas, J.J., Maximova, E., Abel, C., Schlereth, A., Soja, A.M., Blasing, O.E., Lunn, J.E., Vernoux, T., Stitt, M., 2016. Reproductive failure in *Arabidopsis thaliana* under transient carbohydrate limitation: flowers and very young siliques are jettisoned and the meristem is maintained to allow successful resumption of reproductive growth. *Plant Cell Environ* 39, 745-767.
- Nakayama, N., Smith, R.S., Mandel, T., Robinson, S., Kimura, S., Boudaoud, A., Kuhlemeier, C., 2012. Mechanical regulation of auxin-mediated growth. *Curr Biol* 22, 1468-1476.
- Noh, B., Bandyopadhyay, A., Peer, W.A., Spalding, E.P., Murphy, A.S., 2003. Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* 423, 999-1002.
- Petrasek, J., Friml, J., 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675-2688.
- Procko, C., Burko, Y., Jaillais, Y., Ljung, K., Long, J.A., Chory, J., 2016. The epidermis coordinates auxin-induced stem growth in response to shade. *Genes Dev* 30, 1529-1541.
- Rakusova, H., Gallego-Bartolome, J., Vanstraelen, M., Robert, H.S., Alabadi, D., Blazquez, M.A., Benkova, E., Friml, J., 2011. Polarization of PIN3-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 67, 817-826.
- Salazar-Irribé, A., Agredano-Moreno, L.T., Zúñiga-Sánchez, E., Jiménez-García, L.F., Gamboa-deBuen, A., 2016. The cell wall DUF642 At2g41800 (TEB) protein is involved in hypocotyl cell elongation. *Plant Sci* 253, 206-214.
- Salazar-Irribé, A., Zúñiga-Sánchez, E., Zavaleta-Mejía, E., Gamboa-deBuen, A., 2017. Cell wall localization of two DUF642 proteins, BIIDX1 and TEEBE, during *Meloidogyne incognita* early inoculation. *The Plant Pathology Journal*.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108.
- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballare, C.L., Sandberg, G., Noel, J.P., Chory, J., 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133, 164-176.
- Team., R.C., 2017. R: A language and environment for statistical computing.
- Vázquez-Lobo, A., Roujol, D., Zúñiga-Sánchez, E., Albenne, C., Piñero, D., Gamboa-de Buen, A., Jamet, E., 2012. The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein family: phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides *in vitro*. *Mol Phylogenet Evol* 63, 510-520.
- Yamada, M., Greenham, K., Prigge, M.J., Jensen, P.J., Estelle, M., 2009. The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol* 151, 168-179.
- Zheng, Z., Guo, Y., Novak, O., Chen, W., Ljung, K., Noel, J.P., Chory, J., 2016. Local auxin metabolism regulates environment-induced hypocotyl elongation. *Nat Plants* 2, 16025.
- Zúñiga-Sánchez, E., Soriano, D., Martínez-Barajas, E., Orozco-Segovia, A., Gamboa-deBuen, A., 2014. BIIDX1, the At4g32460 DUF642 gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during *Arabidopsis thaliana* seed germination and plant development. *BMC Plant Biol* 14, 338.

Supplemental figures



Supp. Figure 1. Effect of auxin on hypocotyl elongation of *TEB* overexpression and mutant lines. Effect of IAA and NPA on hypocotyl length from WT, *OETEB*, and *teb-1* and *teb-2*. Seeds were sown on MS and MS with IAA (1 μ M) or NPA (2 μ M) and 7-d hypocotyl length was determined. Three biological replicates were performed. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA ($P < 0.05$).

Como se ha visto en el artículo anterior, el uso de los anticuerpos LM19 (específico para pectinas casi totalmente desmetil esterificadas) y LM20 (específico para pectinas casi totalmente esterificadas), sugiere que la mutante *bdx-1* presenta en la epidermis del hipocótilo menor cantidad de pectinas desmetil esterificadas y mayor cantidad de pectinas metil esterificadas con respecto a la WT (Capítulo 3 Fig. 3).

Por otra parte, los resultados también sugieren un cambio en la distribución del transportador de auxinas PIN1. Preparaciones de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo contra este transportador, indican mayor presencia de PIN1 en las paredes laterales de los hipocótilos *bdx-1* con respecto a los hipocótilos de las WT que parecen tenerlo más representativamente en las paredes transversales (Capítulo 3 Fig. 2E-F). Este cambio sería consistente con que los hipocótilos de las plantas *bdx-1* crecidas en condiciones normales, presentan mayor acumulación de auxinas en la epidermis, con respecto a las WT en las que se detectan a las auxinas mayormente en el tejido vascular (Capítulo 3 Fig. 2A-D).

Discusión general

La pared celular vegetal es una estructura involucrada en procesos de división, diferenciación y elongación celular a lo largo de todo el desarrollo de las plantas. Reportes previos y este trabajo muestran que cambios en la morfología de los órganos y hasta la reducción en la capacidad reproductiva de las plantas pueden asociarse con las alteraciones en la arquitectura de la pared celular. El conocimiento de proteínas con actividad enzimática dentro de la pared celular, que pueden modificar químicamente a las pectinas, ha sido estudiado extensamente en varias zonas de la planta en distintas fases de su desarrollo. BDX es una proteína que modula la actividad de PME's. En las líneas de baja expresión de *BDX* se presenta un fenotipo de silicuas más cortas, menor cantidad de semillas algunas de las cuales son amorfas con respecto a las WT (Zúñiga Sánchez *et al.*, 2014).

Durante el desarrollo de la semilla, la modificación química de la pared celular es relevante en múltiples eventos, por ejemplo; en procesos de histodiferenciación en el embrión, en la celularización y muerte celular programada del endospermo, o cuando se observa el proceso de expansión celular en varios tejidos. Posteriormente, en una semilla madura y durante la germinación, las paredes celulares también intervienen activamente al inicio de la ruptura de la testa y el endospermo, durante la expansión celular relacionada al alargamiento de la radícula, y durante la degradación y movilización de las reservas en tejidos de almacenamiento (Gómez-Maqueo y Gamboa deBuen, 2016). La participación de BDX en procesos donde la pared celular interviene en el desarrollo de la semilla ha sido comprobada en el capítulo 2 de este trabajo contribuyendo a los hallazgos de Zúñiga-Sánchez *et al.*, 2014. En este trabajo se determinó la participación del grado de esterificación de las pectinas durante la elongación y plegamiento del embrión WT. En las semillas amorfas de la línea mutante *bdx-1*, los patrones de desmetil esterificación de las pectinas en las paredes celulares del endospermo se encuentran alterados.

El grado de desmetil esterificación de las pectinas en la pared celular del endospermo es determinante para un desarrollo apropiado del embrión durante la maduración de la semilla. Durante el desarrollo, las semillas WT presentaron un patrón diferencial de pectinas desmetil esterificadas, con mayor concentración en las zonas del endospermo cercanas a las zonas del embrión que se encuentran elongando y curvándose, posiblemente involucradas en facilitar el plegamiento correcto. En el modelo descrito por Fourquín *et al.*, 2016, el endospermo y la cubierta seminal, capas externas al embrión, ejercen una restricción física durante la elongación y plegamiento del embrión y los cambios en el patrón

de esterificación de las pectinas podrían estar involucrados en el estado de rigidez de las paredes celulares de estos tejidos en función del desarrollo de la semilla.

El análisis enfocado en la morfología de las semillas en este trabajo demostró que las alteraciones visibles de las semillas de la línea mutante *bdx-1* ocurre en aproximadamente el 40% del total y son consecuencia del plegamiento anormal del embrión (Fig. 1 Cap. 2). En las semillas amorfas de la línea *bdx-1*, se observó una mayor cantidad de pectinas metil esterificadas en el endospermo cercano a la región de los cotiledones a partir de la fase de torpedo, con respecto a las semillas *bdx-1* normales y las WT. A pesar de que no existe una correlación clara entre un mayor grado de esterificación de las pectinas y una mayor rigidez de la pared celular, en algunos de los procesos de desarrollo vegetal (Wolf y Greiner, 2012), una mayor concentración de pectinas metil esterificadas está relacionada con una pared rígida. Con base en el modelo descrito anteriormente, los cambios en los patrones de esterificación de las pectinas en la pared celular del endospermo en *bdx-1*, podrían asociarse con una mayor restricción física del endospermo durante el desarrollo embrionario, alterando el crecimiento y arreglo embrionario dentro de la semilla. Asimismo, las pectinas metilesterificadas no son sustrato de las poligalacturonasas inducidas durante el proceso de muerte celular programada del endospermo (Lee *et al.*, 2012). Los embriones vivos y malformados procedentes de semillas amorfas de la línea *bdx-1*, también dieron origen a plántulas con morfología alterada. Estos resultados sugieren que la alteración en el grado de desmetilesterificación de las pectinas durante el desarrollo de las semillas *bdx-1* determinan las diversas morfologías anómalas tanto del embrión como de las plántulas.

El número reducido de semillas en la mutante *bdx-1* puede ser consecuencia de diferentes eventos en su desarrollo. La mutante *bdx-1* presenta óvulos normales pero un porcentaje de los granos de polen está estructural y funcionalmente afectado. Dado que *BDX* no se expresa en los granos de polen, estas alteraciones visibles (colapsados y sin citoplasma, Fig. 10 D, E) no pueden ser atribuidas directamente a este gen. Alteraciones similares en la morfología del polen han sido descritas en mutantes relacionadas con la vía de señalización de auxinas incluyendo su síntesis y transporte (Cardarelli y Cechetti, 2014). Por lo tanto, las alteraciones estructurales y funcionales de los granos de polen en la mutante *bdx-1* podrían deberse a un cambio en la distribución y concentración de las auxinas durante el desarrollo tardío de los estambres dado que se ha establecido que el cambio en el grado de esterificación de las pectinas altera la ubicación de proteínas de membrana incluyendo los transportadores PIN (Braybrook y Peaucelle, 2013).

La complejidad anatómica y funcional de los estambres dificulta la posibilidad de demostrar una relación entre BDX, el grado de esterificación de las pectinas y los transportadores de auxinas. El uso del hipocótilo, modelo con una anatomía sencilla, permitiría demostrar una relación entre los cambios en la metil esterificación de las pectinas y la localización de los transportadores PIN en las mutantes *bdx-1*. Específicamente, la epidermis participa activamente en la elongación del hipocótilo en diferentes condiciones ambientales y en respuesta a la gravedad. Por otro lado, aunque las malformaciones de las plántulas pueden ser atribuidas al desarrollo inadecuado del embrión, BDX sí participa en la elongación del hipocótilo en respuesta a distintas condiciones ambientales (Capítulo 3 Fig. 1). Los hipocótilos de la mutante *bdx-1* son más largos con respecto a las WT en condiciones de temperatura normales (22°C), mientras que las plantas de sobreexpresión son más cortas (Capítulo. 3 Fig. 1). Las células de la epidermis del hipocótilo de la mutante *bdx-1* presentan un mayor grado de esterificación de las pectinas (Capítulo 3 Fig 3). La relación entre el grado de esterificación de las pectinas y la elongación del hipocótilo ha sido previamente descrita en mutantes y líneas de sobreexpresión de PME's y *TEB*, otro gen de la familia DUF642 que además es regulado por auxinas (Salazar-Irribé *et al.*, 2016). Utilizando mutantes de la vía de señalización de auxinas, se ha demostrado la participación de las auxinas en la elongación del hipocótilo (Collet *et al.*, 2000). Los hipocótilos de las plántulas de sobreexpresión de *BDX* y *TEB* presentan resistencia al tratamiento con auxinas exógenas tal como ha sido descrito para la mutante *axr-1* (Collet *et al.*, 2000), mientras que los hipocótilos de las mutantes presentan una mayor acumulación de auxina en las células epidérmicas que posiblemente promueva su mayor elongación (Capítulo 3 Fig. 1 y Supp. Fig. 1). Finalmente, los resultados indican que el transportador PIN1 en las mutantes *bdx-1* se detecta en las paredes transversales de las células de la endodermis y del córtex, a diferencia de los hipocótilos de plantas WT, posiblemente facilitando el flujo de auxinas hacia la epidermis y su acumulación en estas células (Capítulo 3 Fig. 2).

El flujo de auxinas en la respuesta al estrés por calor y al gravitropismo implica una regulación muy fina. La mayor elongación del hipocótilo en respuesta al estrés por calor, por ejemplo, es resultado de una mayor acumulación de auxinas en las células epidérmicas, consecuencia de una menor degradación (Zheng *et al.*, 2016) y/o de un incremento en el transporte (Jia *et al.*, 2016). Para los hipocótilos de *bdx-1*, la menor respuesta al gravitropismo correlaciona con una menor acumulación de auxinas posiblemente resultado de una deslocalización o de un aumento en el tiempo de detección sin reciclaje de los transportadores (Capítulo 3 Fig. 4). Considerando que la deslocalización de los transportadores PIN1 en la respuesta al gravitropismo está relacionada con una mayor

respuesta de las mutantes *mdr-1* (Noh *et al.*, 2003) y que la mutante *bdx-1* presenta el mismo fenotipo, se propone que las alteraciones en el grado de desmetil esterificación de las pectinas presentes en el hipocótilo de esta mutante estarían relacionadas con la deslocalización de los transportadores de auxinas, su posterior acumulación en las células epidérmicas y, finalmente en la elongación celular.

Recientemente, Hocq *et al.* (2017) correlacionaron el modelo ácido de elongación celular con la estructura de las pectinas, sugiriendo que la elongación celular correlaciona con un mayor grado de desmetil esterificación. Estos autores proponen que el incremento en la concentración intracelular de auxinas regula la actividad de una H⁺-ATPasa que controla el pH del apoplasto. Los protones dirigidos hacia el apoplasto acidifican microdominios de la pared celular, proceso que disminuye la actividad enzimática de PME's libres y favorece su unión con las PMEI's e incrementa la actividad de otras enzimas como las poligalacturonasas (PG's), que despolimerizan a las pectinas desmetil esterificadas en cadenas más pequeñas llamadas oligogalacturónidos promoviendo la elongación celular. BDX es una proteína que interactúa *in vitro* con la PME3 y con FLOR1, inhibidor de poligalacturonasas (PGIP) (Zúñiga-Sanchez y Gamboa deBuen, 2012). Los resultados indican que BDX y TEB podrían modular la actividad de las PME's ya que las plantas mutantes *bdx-1* y *teb-1* presentan menor actividad y, en diferentes tejidos, un menor grado de pectinas desmetil esterificadas (Capítulo 3, Fig. 3). Contrario al modelo propuesto por Hocq *et al.* (2017), el hipocótilo de estas mutantes presenta una mayor elongación. Considerando que el grado de desmetil esterificación de las pectinas detectado en los tejidos es consecuencia de un equilibrio entre la actividad de PMEs y PGs y BDX podría alterar este equilibrio participando en el incremento de la actividad de PME's y en la inhibición de las PG's reclutando a FLOR1, y, en consecuencia, en una menor elongación celular.

Los mecanismos por los cuales se da la relación entre la actividad de PME's, el grado de rigidez de la pared celular y el transporte y acumulación de auxinas aún no se encuentra bien establecido. Este trabajo tiene la relevancia de mostrar como dos miembros de la familia DUF642 (BDX y TEB) podrían estar involucrados en este eje de regulación, al modular el grado de desmetil esterificación de las pectinas en las paredes celulares de diferentes tejidos. En particular, en el hipocótilo podrían estar involucrados en modificar el flujo y acumulación de auxinas, modificando su crecimiento, desarrollo y respuesta a diferentes condiciones ambientales (Fig.20).

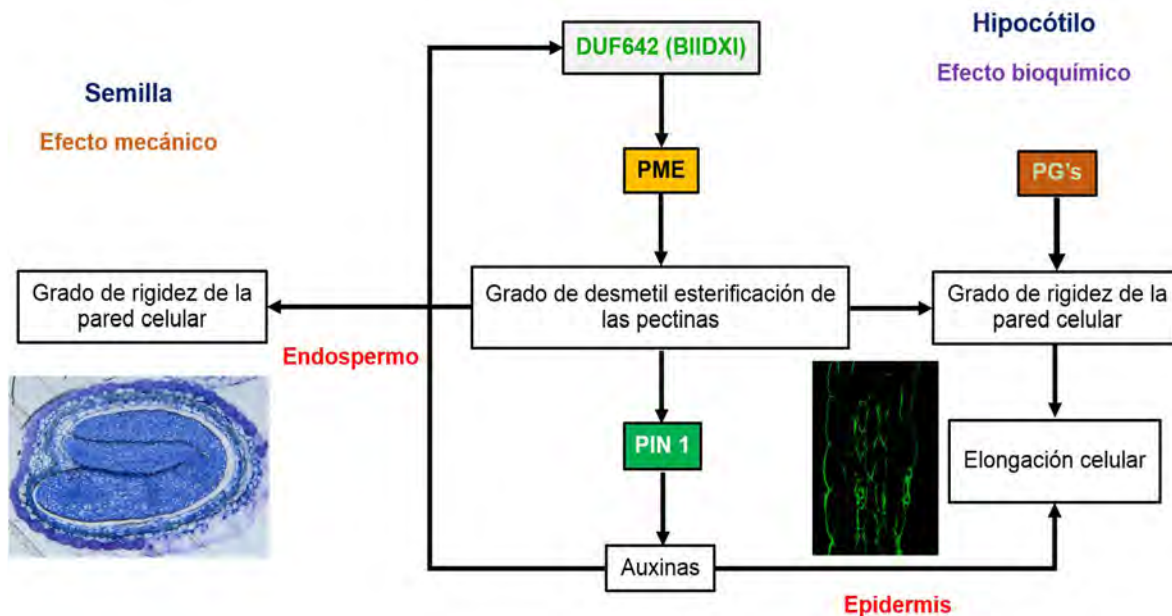


Figura 20. Esquema que ejemplifica la regulación que podrían ejercer las proteínas DUF642 y en específico BDX en el grado de desmetil esterificación de las pectinas y la distribución y/o acumulación de auxinas. La desmetil esterificación de las pectinas es un evento bioquímico que puede ser relacionado con el aumento o disminución de la rigidez de la pared celular. En órganos como el hipocótilo, el crecimiento del órgano podría ser regulado por medio de los cambios bioquímicos dentro de las paredes celulares y específicamente en las pectinas. La distribución de transportadores de eflujo de auxinas dependería del grado de desmetil esterificación de las pectinas, con este evento, la distribución y/o acumulación de esta fitohormona sería regulado, modulando subsecuentemente el crecimiento celular. Enzimas con actividad catalítica podrían ser mayormente responsables del debilitamiento de la pared celular, permitiendo la elongación celular y el crecimiento del órgano. Por otra parte, en el endospermo, la desmetil esterificación de las pectinas en sus paredes celulares sería necesaria para mantener cierto grado de rigidez, relacionada con el crecimiento y plegamiento adecuado del embrión. Un aumento anormal en el grado de metil esterificación de las pectinas, involucraría un incremento en la rigidez de las paredes celulares del endospermo, ejerciendo mayor presión mecánica sobre el embrión y alterando su desarrollo.

Al momento, se conoce que las interacciones entre DUF642 y PME's podría estar relacionada con la distribución y/o acumulación de auxinas y alterar morfológicamente el desarrollo de algún tejido u órgano causando esterilidad masculina parcial y alteraciones en el desarrollo del embrión, eventos que son indispensables para completar el ciclo de vida de las plantas. Profundizar a nivel bioquímico acerca de estas moléculas y sus interacciones posibles es indispensable para mostrar cómo se efectúa este tipo de relación con las PME's a nivel molecular. La cantidad de proteínas que aún no tienen una función conocida es muy grande en el reino vegetal, por lo que el aporte de este trabajo es significativo en el estudio del desarrollo de las plantas.

Conclusión y consideraciones finales.

- BDX regula el plegamiento del embrión de *Arabidopsis* dentro de la semilla por medio de cambios en el grado de desmetil esterificación de las pectinas en las paredes celulares del endospermo.
- BDX y TEB regulan la elongación del hipocótilo probablemente por cambios en la desmetil esterificación de las pectinas en las paredes celulares de la epidermis, involucrando acumulación y transporte de auxinas.
- BDX es una proteína que interviene al menos de forma indirecta en el desarrollo de los granos de polen en *Arabidopsis* y en su capacidad germinativa, probablemente por medio de la acumulación de auxinas activas dentro de las anteras.

Este trabajo sólo es un punto de inicio para comprender de mejor forma como miembros de la familia de proteínas DUF642 participarían activamente en distintos procesos a lo largo del desarrollo de las plantas. A nivel bioquímico sería relevante comprender como se dan las interacciones moleculares entre las proteínas DUF642, y las PME's además de con otros posibles moduladores químicos de la pared celular como PGIP's.

BDX posiblemente participe en otros mecanismos dependientes de la desmetil esterificación de las pectinas, por lo que otros trabajos científicos serían importantes para ampliar el conocimiento de esta proteína y de toda la familia a la que pertenece en el desarrollo vegetal.

Bibliografía

Alvarez-Buylla ER., Benítez M., Corvera-Poiré A., Chaos Cadon A., de Folter S., Gamboa de Buen A., Garay-Arroyo A., García-Ponce B., Jaimes-Miranda F., Pérez-Ruiz RV., Piñeyro-Nelson A., Sánchez-Corrales YE. (2010). *Flower Development. The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists*. First published on March 23, 10.1199/tab.0127.

Azcárraga Rosette MR., Jácquez Ríos MP., Bonfil Campos A., Sandoval Zapotitla E. (2010). *Atlas de Anatomía Vegetal*. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Bennett MD., Leitch IJ., Price HJ., Johnston JS. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (approximately 100 Mb) and *Drosophila* (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of approximately 125 Mb. *Annals of Botany*. 91(5):547-57.

Bowman JL., Baum SF., Eshed Y., Putterill J., Alvarez J. (1999). Molecular Genetics of Gynoecium Development in *Arabidopsis*. *Current Topics in Developmental Biology*. 45:155-205.

Braybrook SA., Peaucelle A. (2013). Mechano-chemical aspects of organ formation in *Arabidopsis thaliana*: The relationship between auxin and pectin. *PLOS One*. 8(3): e57813.

Bucher M., Brunner S., Zimmermann P., Zardi Gl., Amrhein N., Willmitzer L., Riesmeier JW. (2002). The expression of an extensin-like protein correlates with cellular tip growth in tomato. *Plant Physiology*. 128(3):911-23.

Cardarelli M., Cecchetti V. (2014). Auxin polar transport in stamen formation and development: how many actors? *Frontiers in Plant Science*. 16;5: 333.

Cecchetti V., Altamura MM., Falasca G., Costantino P., Cardarelli M. (2008). Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell*. 20(7): 1760-1774.

Cecchetti V., Brunetti P., Napoli N., Fattorini L., Altamura MM., Costantino P., Cardarelli M. (2015). ABCB1 and ABCB19 auxin transporters have synergistic effects on early and late *Arabidopsis* anther development. *Journal of Integrative Plant Biology*. 57(12): 1089-1098.

Carpita NC., Gibeaut DM. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*. 3(1), 1-30.

Caffall KH., Mohnen D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. 28;344(14):1879-900.

- Collett CE., Harberd NP., Leyser O. (2000). Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation, *Plant Physiology*. 124: 553-562.
- Cosgrove DJ. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. 407(6802):321-6.
- Costanzo E, Trehin C, Vandebussche M. (2014). The role of WOX genes in flower development. *Annals of Botany*. Nov; 114 (7):1545-53.
- Feike D., Seung D., Graf A., Bischof S., Ellick T., Coiro M., Soyk S., Eicke S., Mettler-Altman T., Lu KJ., Trick M., Zeeman SC., Smith AM. (2016). The Starch Granule-Associated Protein EARLY STARVATION1 Is Required for the Control of Starch Degradation in *Arabidopsis thaliana* Leaves. *Plant Cell*. Jun;28(6):1472-89.
- Ferrández C., Pelaz S., Yanofsky MF. (1999). Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Review of Biochemistry*. 68:321-54.
- Ferrari S., Sella L., Janni M., De Lorenzo G., Favaron F., D'Ovidio R. (2012). Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in *Arabidopsis* and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Biology (Stuttg)*. Mar;14 Suppl 1:31-8.
- Figueiredo DD., Batista RA., Roszak PJ., Köhler C. (2015). Auxin production couples endosperm development to fertilization. *Nature Plants* 1:15184.
- Fourquin C, Beauzamy L, Chamot S, Creff A, Goodrich J, Boudaoud A, Ingram G. (2016). Mechanical stress mediated by both endosperm softening and embryo growth underlies endosperm elimination in *Arabidopsis* seeds. *Development*. Sep 15;143(18):3300-5.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* *Nature*. 426(6963):147-153.
- Galbiati F., Sinha Roy D., Simonini S., Cucinotta M., Ceccato L., Cuesta C., Simaskova M., Benkova E., Kamiuchi Y., Aida M., Weijers D., Simon R., Masiero S., Colombo L. (2013). An integrative model of the control of ovule primordia formation. *Plant Journal*. 76: 446-455.
- Gao Y., Badejo AA., Sawa Y., Ishikawa T. (2012). Analysis of two L-Galactono-1,4-lactone-responsive genes with complementary expression during the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 53(3):592-601.
- Glasziou KT. (1957). The effect of auxins on the binding of pectin methylesterase to cell wall preparations.
- Gómez-Maqueo X. Gamboa-deBuen A. (2016). The Dynamics of Plant Cell Wall In Muro Modifications and its Physiological Implications on Seed Germination. En: *New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology*.

Araujo S, Balestrazzi A. InTech Editorial. ISBN 978-953-51-2659-1, Print ISBN 978-953-51-2658-4, 210 p.

González-Carranza ZH., Elliott KA., Roberts JA. (2007). Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*.58(13):3719-30.

Guénin S., Mareck A., Rayon C., Lamour R., Assoumou Ndong Y., Domon JM., Sénéchal F., Fournet F., Jamet E., Canut H., Percoco G., Mouille G., Rolland A., Rustérucci C., Guérineau F., Van Wuytswinkel O., Gillet F., Driouich A., Lerouge P., Gutierrez L., Pelloux J. (2011). Identification of pectin methylesterase 3 as a basic pectin methylesterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 192(1):114-26.

Hawkins C., Liu Z. (2014). A model for an early role of auxin in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. *Frontiers in Plant Science* 5:327.

Hehenberger E, Kradolfer D, Köhler C. (2012). Endosperm cellularization defines an important developmental transition for embryo development. *Development*. 139:2031-2039.

Hocq L., Pelloux J., Lefebvre V. (2017). Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. *Trends in Plant Science*. 22(1):20-29.

Iwano M., Shiba H., Miwa T., Che FS., Takayama S., Nagai T., Miyawaki A., Isogai A. (2004). Ca²⁺ dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*.136(3):3562-71.

Jia W., Li B., Li S., Liang Y., Wu X., Ma M., Wang J., Gao J., Cai Y., Zhang Y., Wang Y., Li J., Wang Y. (2016). Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*. 14 e1002550.

Jürgens G. (2001). Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO Journal*. 16;20(14):3609-16.

Kellogg, E. A., Shaffer, H. B. (1993). Model organisms in evolutionary studies. *Systematic Biology*. 42(4), 409-414.

Kieliszewski MJ., Lamport DTA. (1994). Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant Journal*. 5(2):157-72.

Köhler C., Hennig L., Bouveret R., Gheyselinck J., Grossniklaus U., Grissem W. (2003). *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *EMBO Journal*. 22:4804-4814.

Larsson E., Franks RG., Sundberg E. (2013). Auxin and the *Arabidopsis thaliana* gynoecium. *Journal of Experimental Botany*. 64(9): 2619-2627.

Lau S., Slane D., Herud O., Kong J., Jürgens G. (2012). Early embryogenesis in flowering plants: setting up the basic body pattern. *Annual Review of Plant Biology*. 63:483-506.

Lauxmann MA., Annunziata MG., Brunoud G., Wahl V., Koczut A., Asdrubal Burgos., Justyna J. Olas JJ, Maximova E., Abel C., Schlereth A., Soja AM., Bläsing OE., Lunn JE., Vernoux T., Stitt M. (2016). Reproductive failure in *Arabidopsis thaliana* under transient carbohydrate limitation: flowers and very young siliques are jettisoned and the meristem is maintained to allow successful resumption of reproductive growth. *Plant Cell Environment*. 39(4):745-67.

Lee KJD., Dekkers BJW., Steinbrecher T., Walsh CT., Bacic A., Bentsink L., Leubner-Metzger G., Knox JP. (2012). Distinct Cell Wall Architectures in Seed Endosperms in Representatives of the Brassicaceae and Solanaceae. *Plant Physiology*. 160(3): 1551–1566.

McCormick S. (2004). Control of male gametophyte development. *Plant Cell*. 16: S142-53.

Mitchell-Olds, T. (2001). *Arabidopsis thaliana* and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*. 16(12), 693-700.

Müller K., Levesque-Tremblay G., Bartels S., Weitbrecht K., Wormit A., Usadel B., Haughn G., Kermodé AR. (2013). Demethylesterification of Cell Wall Pectins in *Arabidopsis* Plays a Role in Seed Germination. *Plant Physiology*. 161(1):305-16.

Noh B., Bandyopadhyay A., Peer WA., Spalding EP., Murphy AS. (2003). Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature*. 26;423(6943):999-1002.

Ó'Maoiléidigh DS, Graciet E, Wellmer F. (2014). Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytologist*. 201(1):16-30.

Palmeros-Suárez PA., Massange-Sánchez JA, Sánchez-Segura L., Martínez-Gallardo NA., Espitia Rangel E., Gómez-Leyva JF., Délano-Frier JP. (2017). AhDGR2, an amaranth abiotic stress-induced DUF642 protein gene, modifies cell wall structure and composition and causes salt and ABA hyper-sensibility in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*. 245(3):623-640.

Pelloux J., Rustérucci C., Mellerowicz EJ. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*. 12(6):267-77.

Pigliucci M. (1998). Ecological and evolutionary genetics of *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*. 3(12): 485-489.

Pignocchi C, Minns GE, Nesi N, Koumproglou R, Kitsios G, Benning C, Lloyd CW, Doonan JH, Hills MJ. (2009). ENDOSPERM DEFECTIVE1 is a novel microtubule-associated protein essential for seed development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 21:90-105.

Plancot B., Santaella C., Jaber R., Kiefer-Meyer MC., Follet-Gueye ML., Leprince J., Gattin I., Souc C., Driouich A., Vicré-Gibouin M. (2013). Deciphering the responses of root border-like cells of *Arabidopsis* and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant Physiology*. 163(4):1584-97.

Salazar-Irribé A, Agredano-Moreno LT, Zúñiga-Sánchez E, Jiménez-García LF, Gamboa-deBuen A. (2016). The cell wall DUF642 At2g41800 (TEB) protein is involved in hypocotyl cell elongation. *Plant Science*. 253:206-214.

Salazar-Irribé A., Zúñiga-Sánchez E., Mejía EZ., Gamboa-deBuen A. (2017). Cell Wall Localization of Two DUF642 Proteins, BIIDXI and TEEBE, during *Meloidogyne incognita* Early Inoculation. *The Plant Pathology Journal*. 33(6):614-618.

Schmittgen, TD., Livak, KJ. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*. 3, 1101-1108.

Scutt CP., Vandenbussche M. (2014). Current trends and future directions in flower development research. *Annals of Botany*. 114 (7):1399-406.

Shi DQ., Yang WC. (2011). Ovule development in *Arabidopsis*: progress and challenge. *Current Opinion in Plant Biology*. 14(1):74-80.

Smyth DR., Bowman JL., Meyerowitz EM. (1990). Early Flower Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2: 755-767.

Somerville C., Bauer S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredes A., Persson S., Raab T., Vorwerk S., Youngs H. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*. 24; 306(5705):2206-11.

Soto GC. (2009). Tesis: Caracterización funcional de proteínas del tipo acuaporinas en polen maduro de *Arabidopsis thaliana*. UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular.

Swarbreck D., Wilks C., Lamesch P., Berardini TZ., Garcia-Hernandez M., Foerster H., Li D., Meyer T., Muller R., Ploetz L., Radenbaugh A., Singh S., Swing V., Tissier C., Zhang P., Huala E. (2008). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research*. Jan;36(Database issue):D1009-14.

Taiz L., Zeiger E. (2010). *Plant Physiology*. Quinta edición. Sunderland: Sinauer Associates. 782 pp.

Torti S., Fornara F., Vincent C., Andrés F., Nordström K., Göbel U., Knoll D., Schoof H., Coupland G. (2012). Analysis of the *Arabidopsis* shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and a leucine-rich repeat protein that promotes flowering. *Plant Cell*. 24(2):444-62.

Vázquez-Lobo A., Roujol D., Zúñiga-Sánchez E., Pinero D., Albenne C., Gamboa-de Buen A., Jamet E. (2012). The highly conserved spermatophyte cell wall DUF642 protein

family: phylogeny and first evidence of interaction with cell wall polysaccharides in vitro. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 510-520.

Wolf S., Greiner S. (2012). Growth control by cell wall pectins. *Protoplasma*. 249 2:169-75.

Wolf S., Mouille G., Pelloux J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*. 2(5):851-60.

Wolf S., Hématy K., Höfte H. (2012). Growth control and cell wall signaling in plants *Annual Reviews of Plant Biology*. 63:381–407.

Xie X., Wang Y. (2016). VqDUF642, a gene isolated from the Chinese grape *Vitis quinquangularis*, is involved in berry development and pathogen resistance. *Planta*. 244(5):1075-1094.

Yruela I. (2015). Plant development regulation: Overview and perspectives. *Journal of Plant Physiology*. 15; 182:62-78.

Zheng Z., Guo Y., Novak O., Chen W., Ljung K., Noel JP., Chory J. (2016). Local auxin metabolism regulates environment-induced hypocotyl elongation. *Nature Plants*. 2: 16025.

Zúñiga-Sánchez E., Gamboa-deBuen A. (2012). The two DUF642 At5g11420 and At4g32460-encoded proteins interact in vitro with the AtPME3 catalytic domain. *En: Protein Interaction/Book 1*. Cai J, Wang RE. eds. InTech Editorial. ISBN: 979-953-307-5777.

Zúñiga-Sánchez E., Soriano D., Martínez-Barajas E., Orozco-Segovia A., Gamboa deBuen A. (2014). *BIIDX1*, the *At4g32460* DUF642 gene, is involved in pectin methyl esterase regulation during *Arabidopsis thaliana* seed germination and plant development. *BMC Plant Biology* 14:338.

Zúñiga-Sánchez E. (2015). Tesis: Miembros de la familia DUF642 como posibles reguladores de la función de proteínas de la pared celular durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Posgrado en Ciencias Biológicas.

Anexos

A) Extracción de ADN genómico

- 1.- Se corta la estructura de la planta de la cual se va a extraer el ADN y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido en un tubo de 1.5 ml.
- 2.- El tejido congelado se rompe con un pistilo rápidamente, impidiendo la descongelación del tejido.
- 3.- Antes de retirar el pistilo, se adicionan 500 µl de buffer de extracción de ADN*, esperando que se descongele la mezcla. Se retira el pistilo para centrifugar la muestra 10 min. a 13000 rpm. Se toma el sobrenadante y se adiciona en otro tubo.
- 4.- Se le adiciona al sobrenadante 500 µl alcohol isoamílico fenol cloroformo, se mezcla por inversión para centrifugarse durante 10 min. a 13000 rpm.
- 5.- Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se repite el paso anterior.
- 6.- Después de transferir nuevamente el sobrenadante a otro tubo, se adiciona una décima parte del volumen del sobrenadante con acetato de sodio 3 M a 21°C. y 350 µl de isopropanol al 100% a -20°C. Se mezcla por inversión y se deja reposar 5 min. a temperatura ambiente.
- 7.- Se centrifuga la mezcla durante 10 min. a 13000 rpm. y se descarta el sobrenadante.
- 8.- Se lava el “botón” del fondo del tubo con 150 µl de etanol al 70% y se centrifuga durante 5 min. a 13000 rpm.
- 9.- Se repite el paso anterior.
- 10.- Se deja secar el “botón” y se disuelve en aproximadamente 20 µl de agua tridestilada grado biología molecular.

*Buffer de extracción de ADN volumen final (100 ml)

20 ml de TRIS-HCl 1 M a 7.5 pH

5 ml de NaCl 5 M

5 ml de EDTA 0.5 M a 8 pH

5 ml de SDS al 10%

65 ml de H₂O tridestilada.

B) Extracción de ARN

- 1.- Se corta la estructura de la planta de la cual se va a extraer el ARN y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido en un tubo de 1.5 ml.
- 2.- El tejido congelado se rompe con un pistilo rápidamente, impidiendo la descongelación del tejido.
- 3.- Antes de retirar el pistilo, se adiciona 1 ml de trizol, esperando que se descongele la mezcla. Se retira el pistilo para homogeneizar la mezcla y después se adicionan 200 μ l de cloroformo por cada mililitro de trizol. Se agita gentilmente durante 15 s.
- 4.- Se centrifuga la muestra durante 15 min. a 10000 rpm. en condiciones de 4°C.
- 5.- Se toma el sobrenadante (fase acuosa, aprox. 600 μ l) y se adiciona en otro tubo.
- 6.- Se precipita la mezcla con 500 μ l de isopropanol por mililitro de trizol adicionado.
- 7.- Incubar a 21 °C durante 10 min.
- 8.- Centrifugar durante 10min. a 10000 rpm. en condiciones de 4°C.
- 9.- Remover el sobrenadante y lavar el “botón” con 1 ml. De etanol al 70% por mililitro de trizol usado.
- 10.- Centrifugar durante 5 min. a 10000 rpm. en condiciones de 4°C.
- 11.- Remover el etanol y dar un “spin” para eliminar la mayor cantidad de etanol posible sin tocar el “botón”.
- 12.- Resuspender el “botón” entre 20-30 μ l de agua tridestilada grado biología molecular.
- 13.- Añadir 1 μ l inhibidor de RNAsas y adicionar 1 μ l de DNAsa I.

C) Síntesis de ADNc

1.- Preparar una mezcla en un tubo de 1.5 ml con lo siguiente:

- 1 μ l de Oligo dt (500 μ g/ml).
- 1 μ l de la muestra de ARN extraído (generalmente 100 ng).
- 1 μ l de dNTP's.
- 9 μ l de agua tridestilada grado biología molecular.

2.- Se incuba la mezcla durante 5 min. a 65 °C.

3.- Se pasa la mezcla a un contenedor con hielo.

4.- A la preparación se adiciona:

- 4 μ l de buffer 5X first strand
- 2 μ l de DTT 0.1 M (cofactor)

5.- Incubar la mezcla durante 2 min. a 42 °C.

5.- Se adiciona 1 μ l de superscript II RT y se incuba la mezcla a 42 °C durante 50 min.

6.- Se calienta durante 15 min. la preparación a 70 °C para inactivarla.