



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DE
FLORES DE TRES ESPECIES
VEGETALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

Edith del Rocío García Hernández

DIRECTORA DE TESIS: Dra. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ

MÉXICO, D F.

MAYO 2008



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.

ARADECIMIENTOS

A la Dra. Gladys I. Cassab López, por su inagotable paciencia y respeto. Por haber confiado en mi, y brindarme las circunstancias materiales e intelectuales para realizar este humilde trabajo. También porque no fue vencida por mis errores.

A los Drs. Marco Villanueva Méndez y Cecilia B. Peña Valdivia, miembros de mi Comité Tutorial por sus valiosas recomendaciones e interés en el trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Manuelito Saucedo, Alejandra, Rosario, Geo Ponce, María Luisa, Claudia y Caro por su interés, apoyo e invaluables sugerencias.

A la MC. Maria Eugenia Campos quien se esforzó en enseñarme el valor de la limpieza, el orden y la constancia en el trabajo experimental. Por su paciencia y fineza de trato, y por su sonrisa.

A Yoloxochitl Sánchez por su enorme calidad humana, por su calidez y solidaridad.

A Mónica y Moisés por su cariño y apoyo incondicional.

Al consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), quien me proporcionó el sostén económico sin el cual no hubiera cursado el doctorado. (No. de beca 80369).

A la UNAM, que desde la preparatoria me ha dado las herramientas para mejorar mi formación académica y mi calidad de vida.

A la UACH que me ha dado la oportunidad de vivir de manera honesta y servir a mi prójimo.

A Dios por hacer posible todo lo anterior.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	
1. Pared celular	
1. 1 Importancia	1
1. 2 Composición	1
1. 3 Estructura	5
1. 4 Uniones e interacciones entre los componentes de la pared	5
2. Proteínas de la pared	
2. 1 Enzimas y agentes modificadores de la pared	7
2. 2 Características de las proteínas estructurales de pared	11
2. 3 Extensinas	12
2. 4 PRPs	14
2. 4 .1 Nodulina ENOD2	15
2.5 AGPs	16
2.6 Otras proteínas estructurales de la pared	17
3. Matriz extracelular de tejidos sexuales	
3.1 Generalidades	17
3.2 Proteínas estructurales del gineceo	19
3.3 Proteínas estructurales del androceo	25

4. Polen y germinación	
4.1 Estructura del grano de polen	27
4.2 Hidratación del polen <i>in vivo</i>	28
4.3 Germinación del polen	28
4.4 Características distintivas del tubo polínico	
4.4.1 Crecimiento apical	29
4.4.2 Distribución de organelos	29
4.5 Estructura y composición de la pared del tubo polínico	32
4.5.1 Proteínas estructurales del tubo polínico	33
5. Boro	
5.1 Importancia del boro en las plantas	35
5.2 Boro y pared celular	36
5.3 Efecto de la deficiencia de boro en el tubo polínico	39
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	40
III. MATERIALES Y MÉTODOS	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	
IV.1 Polen y su relación con el boro	
IV.1.1 Efecto del boro en la germinación <i>in vitro</i> del polen de cinco especies de plantas	49
IV.1.2 Distribución de hidroxiprolina en polen germinado de cinco especies de plantas	51
IV.1.3 Inmunolocalización de extensinas y PRPs en polen germinado de maíz, tabaco, pino e <i>Impatiens</i> sp.	55

I	61
V. 1.4 Análisis tipo Western blot de la fracción extraíble en CaCl ₂ del tubo polínico de maíz.	63
IV.2 Otros experimentos con polen:	66
IV.2.1 Inmunolocalización de PRPs	68
IV.2.2 Localización de tapones de calosa y HRGPs en tubo polínico de maíz y tabaco	70
IV.2.3 Efecto del anticuerpo de anti-cuerpo de anti-extensina de testa de soya en la formación del tubo polínico	72
IV.3 Experimentos con tejidos sexuales femeninos	74
IV.3.1 Determinación colorimétrica de la concentración de HRGPs en tejidos sexuales de maíz, tabaco e <i>Impatiens</i> sp.	76
IV.3.2 Electroforésis y Western blot de la fracción extraíble en CaCl ₂ del pistilo de maíz, tabaco e <i>Impatiens</i> sp.	82
IV.3.3 Comparación entre patrones electroforéticos y análisis tipo Western blot de polen y pistilo de maíz	84
IV.3.4 Análisis tipo Northern blot de tejidos sexuales de maíz, tabaco y pino	85
V. CONCLUSIONES	97
VI. PERSPECTIVAS	
VII. LITERATURA CITADA	
VII. APENDICE: ARTICULO PUBLICADO	

NDICE DE CUADROS

No.		Página
1.	Tipo de uniones de los polímeros de la pared celular	6
2.	Enzimas y uniones entre polímeros de la pared celular	9
3.	Determinación de AGPs en distintas especies de plantas mediante anticuerpos	22
4.	Porcentaje de germinación del polen de cinco especies de plantas germinado en medio deficiente de boro (-B) o suficiente (+B). <i>Impatiens</i> sp. 0.5 mM; maíz 1.0 mM; tabaco 1.6 mM; pino 1.66 mM; lirio 0.162 mM de ácido bórico. El promedio corresponde a datos de seis repeticiones. (<u>±</u> : desviación o error estándar)	49
5.	Longitud del tubo polínico (μm) del polen de cinco especies vegetales germinado en medio deficiente de boro (-B) o medio suficiente (+B). Tiempo (h) de incubación del polen en el medio de germinación: ¹ (8); ² (2); ³ (24), ⁴ (9), ⁵ (6). (<u>±</u> : desviación o error estándar)	50
6.	Niveles de hidroxiprolina total (Hyp_{Tot} : $\mu\text{gHyp}/\text{mg}$ peso seco) del polen de cinco especies vegetales	52
7.	Distribución de hidroxiprolina (Hyp) en la pared celular del tubo polínico. (A) : HRGPs totales (Hyp_{Tot}), (B) : HRGPs unidas de manera no covalente (Hyp_{Ext}), (C) : HRGPs unidas covalentemente a la pared (Hyp_{Ins}). (<u>±</u> : desviación o error estándar).	53
8.	Distribución de hidroxiprolina en la pared celular de gineceos de maíz, tabaco e <i>Impatiens</i> sp. (A) : HRGPs totales (Hyp_{Tot}), (B) : HRGPs unidas de manera no covalente (Hyp_{Ext}), (C) : HRGPs unidas covalentemente a la pared (Hyp_{Ins}). (D) longitud del pistilo (<u>±</u> : desviación o error estándar).	72

ÍNDICE DE FIGURAS

No.		Página
1.	Modelo en que se ilustra el arreglo de polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos de la pared celular vegetal.	3
2.	Representación esquemática de los componentes subcelulares involucrados en la biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular vegetal.	8
3.	Esquema que muestra la estructura subcelular y distribución de organelos del tubo polínico.	30
4.	Entrecruzamiento borato-éster que ocurre entre la apiosa de la fracción RGII de la sustancias pécticas	37
5.	Inmunolocalización de extensinas y PRPs en polen de maíz germinado en condiciones suficientes +B (A y B) y deficientes de boro -B (C y D). Después de fijadas las muestras fueron incubadas (B y D) con el anticuerpo primario antiextensina de testa de soya y con suero preinmune (A y C). El anticuerpo secundario fue anti-conejo IgG conjugado con fosfatasa alcalina. Notar que la señal se presenta en el tubo polínico en +B (B) y en la región adyacente al grano donde ocurre la ruptura (D). Barra = 911 μ m.	57
6.	Inmunodetección de extensinas y PRPs en polen de tabaco germinado en medio suplementado con boro +B (A y B) y sin boro -B (A y C). El polen germinado en ambas condiciones fue fijado y tratado con suero preinmune (A y C) y con anticuerpo primario antiextensina PRP de soya (B y D). Se utilizó un anticuerpo secundario de anti-conejo IgG conjugado con fosfatasa alcalina. La flecha indica que la señal se presentó en pared celular del tubo polínico en B y D, mientras que las muestras tratadas con suero preinmune carecen de señal. Barra = 363 μ m.	58
7.	Inmunolocalización de extensinas y PRPs en polen de <i>Impatiens</i> . revelado por el método de tinción de oro-plata coloidal A y B polen germinado en condiciones de suficiencia de boro (+B). C y D polen germinado en condiciones de deficiencia de boro (-B). A y C polen germinado y tratado con suero preinmune.	

- B y D polen germinado y tratado con anticuerpo antiextensina de soya y PRP.
La flecha indica que la señal se presentó heterogéneamente en la pared del tubo polínico en B y D. Barra = 911 μm . 59
8. Inmunodetección de extensinas y PRP en polen de pino germinado *in vitro* en condiciones de deficiencia de boro (A y C) y suficiencia (B y D). Las muestras fueron fijadas e incubadas con anticuerpo primario antiextensina de testa de soya (B y D) y con suero preimmune (A,C). Como anticuerpo secundario se usó anti-conejo IgG conjugado a fosfatasa alcalina. Barra = 911 μm . Notar que la señal es difusa en la pared celular del tubo polínico (B y D), mientras que A y C, tratadas con suero preimmune carecen de señal. 60
 9. Caracterización de proteínas de pared del tubo polínico de maíz extraíbles en CaCl_2 . (A) Patrón electroforético SDS-PAGE (12%) del extracto obtenido en medio suficiente +B y medio deficiente de boro -B. (B) Western blot correspondiente en que se utilizó un anticuerpo antiextensina de testa de soya. Notar la ausencia de las dos bandas correspondientes a HRGPs en +B. 62
 10. Inmunolocalización de PRPs en polen germinado de tabaco (A, B) y maíz (C, D). Reacción preimmune (A,C) e inmune (B, D), después de fijadas las muestras fueron incubadas con anti p33 y p36 de frijol. Notar que la señal se presenta en polen y tubo polínico en B y D. Barra = 911 μm . 65
 11. Inmunolocalización de extensinas y PRPs en polen germinado de maíz. Después de germinado el polen fue fijado e incubado con suero preimmune (A) y con el anticuerpo primario antiextensina de soya (B). Imagen de fluorescencia del polen teñido con azul de anilina(C). La flecha indica que la acumulación de extensinas y PRP podría coincidir con tapones de calosa. Barra = 363 μm . 67
 12. Efecto de la adición del anticuerpo antiextensina de testa de soya en la germinación *in vitro* de polen de tabaco. (A) dilución 1:50. (B) dilución 1:20. Control anticuerpo antiprofilina de frijol, dilución 1:20. (C).Barra 363 μm . 69
 13. Fotografía que muestra la diferencia de longitud entre pistilos de (A) maíz, (B) *Impatiens* sp. y (C) tabaco. 71
 14. Caracterización de la fracción extraíble en CaCl_2 de pistilos de maíz (M), tabaco (T) e *Impatiens* sp. (I). (A) patrón

- electroforético SDS-PAGE 12%. B) Western blot del que contenía un anticuerpo primario antiextensina de testa de soya. 73
15. Análisis tipo Northern blot (A) y electroforesis (B) correspondiente a flores femeninas (Mf) y masculinas de maíz (Mm); pistilo (Tg) y androceo de tabaco (Ta). Hibridación de conos masculinos de pino (C). Las muestras se obtuvieron de plantas en antesis y fueron hibridadas a alta astringencia con un fragmento de 1400 pb de ENOD2 de frijol. 77
16. Northern blot (A) y electroforesis correspondiente a y (B) cáliz (Ca), corola (Co), gineceo (Gin) y androceo (An) de flores de tabaco. Las muestras se obtuvieron de plantas en antesis, hibridadas a alta astringencia con un fragmento de 1400 pb de ENOD2 de frijol. 78
17. Análisis tipo Northern blot (A) y electroforesis correspondiente a (B) raíz (R), tallo (T), hoja (H) y flor de tabaco (F). Las muestras se obtuvieron de plantas en antesis, hibridadas en alta astringencia, con un fragmento de 1400 pb de ENOD2 de frijol. 79
18. Análisis tipo Northern blot (A) y electroforésis de flor (F), flor con herida (Fh) y flor senescente de tabaco (Fs). Las muestras se obtuvieron de plantas en antesis hibridadas con alta astringencia con un fragmento de 1400 pb de ENOD2 de frijol. 81

ABREVIATURAS

AcGlu	ácido glucorónico
α-D-GalpA	forma piranosa del ácido galactosilurónico
AGPs	proteínas arabinogalactanas
Ara	arabinosa
-B	boro independientes
+B	boro dependientes
Cys	cisteína
ENOD	nodulina temprana “early nodulin”
Gal	galactosa
Gly	glicina
GRP	proteínas ricas en glicina
His	histidina
HRGPs	glicoproteínas ricas en hidroxiprolina
Hyp	hidroxiprolina
Hyp_{Tot}	hidroxiprolina total
Hyp_{Ext}	hidroxiprolina extraíble en CaCl ₂
Hyp_{Ins}	hidroxiprolina insoluble
KDO	ácido 3-deoxy-mano-octulosónico
L—Rhap	forma piranosa de la L-rafnosa
Lys	lisina
PRPs	proteínas ricas en prolina
RGI	ramnogalacturonanas-I

RGII	ramnogalacturonanas-II
mRGII	forma monomérica de las ramnogalacturonanas-II
dRGII	forma dimérica ramnogalacturonanas-II
Rha	ramnosa
RLK	receptores tipo cinasa
Ser	serina
Thr	treonina
Tyr	tirosina
Val	valina
XET	xiloglucan-endotransglicosilasas
Xylp	forma piranosa de la xilosa

RESUMEN

Las proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), son las proteínas estructurales más abundantes en tejidos sexuales de mono y dicotiledóneas. Éstas intervienen en múltiples funciones además de la estructural. El boro es un micronutriente esencial para la sobrevivencia de plantas vasculares, más del 90% del boro celular se localiza en la pared. En el presente trabajo, se investigó la relación del boro con las proteínas ricas en hidroxiprolina durante la germinación *in vitro* del polen, de dos especies vegetales con requerimiento de boro (+B), y tres que germinan sin él (-B). También, se determinó la distribución de estas proteínas en conos masculinos de pino y en flores de maíz y tabaco.

La adición de ácido bórico, incrementó 14 veces el porcentaje de germinación de maíz y triplicó el de tabaco. Contrariamente, en el polen de *Impatiens* sp. pino y lirio no hubo cambios significativos en el porcentaje de germinación en medio deficiente y suficiente de boro. Sin embargo, la longitud del tubo polínico de las tres últimas especies se duplicó en presencia de boro.

La determinación colorimétrica de proteínas ricas en hidroxiprolina, mostró que existe relación entre el boro y los niveles de hidroxiprolina (Hyp) del tubo polínico de maíz. El incremento gradual de boro hasta 1 mM, aumentó los niveles de hidroxiprolina total (Hyp_{Tot}), hasta alcanzar el 63% de la Hyp total del grano. En esta concentración, también se duplicó la hidroxiprolina de la pared celular extraíble en CaCl₂, (Hyp_{Ext}) y la hidroxiprolina insolubilizada de la pared (Hyp_{Ins}), en referencia a la concentración de 0.5 mM de ácido bórico.

Por otra parte, la inmunolocalización de extensinas y proteínas ricas en prolina (PRPs) en polen germinado de maíz, tabaco, *Impatiens* sp. y pino, en medio deficiente y suficiente, con el anticuerpo antiextensina de soya, aunada a la evaluación de hidroxiprolina total del polen de especies con y sin requerimiento de boro, sugiere que existen diferencias en los niveles de Hyp total en el tubo polínico de ambos grupos. En cambio, la inmunodetección de las proteínas ricas en prolina P33/36, relacionadas con procesos de adhesión, indicó que éstas se localizan tanto en el grano como en el tubo polínico.

El análisis tipo Western blot de la fracción extraíble de proteínas ricas en hidroxiprolina de polen de maíz germinado en medio deficiente y suficiente mostró dos bandas en el primer caso, y en medio suficiente ninguna. Lo anterior sugiere, que el boro podría favorecer la insolubilización de extensinas y proteínas ricas en prolina, con uniones covalentes a la pared.

Para determinar la importancia del ensamblaje de extensinas en la pared del tubo polínico durante la germinación *in vitro*, se agregó anticuerpo de antiextensina de soya al medio de germinación. Sin embargo, no se observaron cambios notables en la morfología con microscopía óptica.

No se encontró relación entre la longitud del pistilo y la concentración de hidroxiprolina en la pared celular de maíz, tabaco e *Impatiens* sp.

Finalmente, transcritos homólogos de la nodulina ENOD2 de frijol fueron determinados en androceo y gineceo de tabaco y maíz, en conos masculinos de pino y en cáliz, corola, tallo y hoja de tabaco. El patrón de expresión de los transcritos, parece indicar que los homólogos de ENOD2: a) corresponden a proteína(s) que contienen secuencias afines a proteínas ricas en prolina y/ o

extensinas, b) que no son tejido específicas, y c) que su expresión se incrementa con las alteraciones por herida y se reduce con la senescencia.

ABSTRACT

Hydroxyproline rich glycoproteins (HRGPs) are the most abundant structural cell wall proteins in sexual tissues of monocotyledons and dicotyledons plants. These proteins participate in multiple functions, in addition to the structural. Here, we investigated the effect of boron during on *in vitro* germination of five species of plants, on hydroxyproline rich glycoproteins insolubilization on the cell wall. We also studied the distribution of hydroxyproline rich glycoproteins in flowers of tobacco, maize and pine cones.

Boron (B) is an essential micronutrient for the survival of vascular plants, since most of 90% of boron cellular is located in the wall. Boron addition to pollen of five species of plants, during *in vitro* germination increased 14 times the germination percent of maize, while in tobacco was triplicated. Unlike pollen of *Impatiens* sp., pine and lily do not show significant changes in the percentage of germination, in deficient (-B) and sufficient medium (+B). However in the three last species, the length of pollen tube was doubled.

Colorimetric measures of hydroxyproline rich glycoproteins showed that 63% of Hyp_{Tot} of pollen of maize was located in the pollen tube cell wall. The increase of boron concentration to 1mM produces the highest amounts of hydroxyproline in three cellular fractions: cell wall total (Hyp_{Tot}), CaCl₂ extractable (Hyp_{Ext}), and cell wall insoluble (Hyp_{Ins}).

On the other hand, immunolocalization of extensins and proline rich proteins (PRPs) of germinated pollen of maize, tobacco, *Impatiens* sp. and pine in deficient and sufficient medium, showed higher deposition of these proteins in pollen grown

in sufficient medium in contrast to those germinated in deficient medium. The immunodetection of homologous proline rich proteins, P33/36 which are related with the processes of adhesion, indicated that these are located in the grain as well as in the pollen tube. In addition, the concentration of hydroxyproline rich proteins increased in relation with the pollen tube length in pollen germinated in sufficient medium.

Western blot assay from extractable cell wall fractions of pollen grown in deficient conditions shown two bands meanwhile, in sufficient conditions do not shown any one. We concluded that boron could induce changes in the insolubilization of hydroxyproline rich proteins.

To determine the importance of extensins in the assembly of proteins into cell walls of germinating pollen tubes, we added antiextensin antibody to the germination medium. However, we did not observe by optical microscopy remarkable changes in pollen tube morphology.

Also, we studied the relationship between longitude of pistils of *Impatiens* sp., tobacco and maize with the concentration of cell wall hydroxyproline. There was not a clear correlation between longitude of pistil and concentration of cell wall Hyp in these species.

The electrophoretic pattern and western blot analysis of cell wall proteins of pistils from *Impatiens* sp., tobacco and maize were also investigated. In order to study the abundance and molecular weight of the hydroxyproline rich proteins extractable in saline solution, as well as the extensins similar to those from pollen tube. The pistils of these three species, contained proteins with a weight above 100 kDa, and epitopes related to proteins immunolocalized on cell walls of pollen tubes from maize, tobacco and *Impatiens* sp.

On the other hand, mRNA homologous to nodulin ENOD₂ were determined in gynoecium of tobacco, maize and male cones from pine, as well as in, corolla, calyx, and leaf of tobacco. The expression pattern of these mRNAs seems to indicate that homologous ENOD₂, is could correspond to proteins (a) that contained sequences similar to proline rich proteins and extensins. Furthermore, these mRNAs were not organ specific and their expression increased after wounding and reduced during senescence.

I. INTRODUCCIÓN

1. Pared celular

1.1 Importancia

La pared celular o matriz extracelular vegetal es el conjunto de material que rodea al protoplasto, comprende la zona de unión con la membrana plasmática, las paredes primaria y secundaria y el espacio intercelular. Su grosor varía entre 0.1 y 10 μm (Cosgrove, 2005; Buchanan et al., 2000). La pared celular es una región metabólicamente dinámica, involucrada en la morfogénesis, dirección del crecimiento, diferenciación de tejidos, protección, reconocimiento y señalización (Pennell, 1998). La morfología y arreglo de las paredes celulares de los tejidos vegetales, constituyen un criterio útil para clasificarlos. Además, es de significativa importancia en la obtención de productos alimenticios, textiles, medicinales e industriales (Carpita y Gibeaut, 1993; Fry, 2004). La relevancia de la pared celular es evidente, pues cerca del 15% del genoma de *Arabidopsis* codifica proteínas involucradas con su biogénesis y modificación. A la fecha se han identificado aproximadamente 400 proteínas implicadas en la síntesis de polímeros de la pared (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

1.2 Composición

La pared celular está constituida por polisacáridos, derivados fenólicos y lipídicos, proteínas, Ca^{2+} , B (boro) y agua. Ésta última, constituye hasta el 80% de sus componentes y determina parcialmente la flexibilidad y extensibilidad de la

pared. Además el agua contribuye al mantenimiento de las propiedades gélicas de pectinas y hemicelulosas (Levy y Staehelin 1992; Knox, 1995).

Los polímeros de la pared están organizados en dos tipos de componentes, el fibrilar y el matricial. El primero comprende el total de las microfibrillas de celulosa que imparte resistencia mecánica a la pared. El matricial contiene hemicelulosas, pectinas y los componentes restantes (Brett y Waldron, 1990; Cosgrove, 2000).

La celulosa (β 1 \rightarrow 4) glucanos) constituye hasta el 30% del peso seco de la pared primaria, y cerca del 90% de la secundaria. Las microfibrillas de celulosa de la pared primaria son elípticas en cortes transversales, con ejes de 50 a 300 Å y se disponen sobre la superficie interna de la pared previamente formada por aposición (Fig. 1). La celulosa es sintetizada por un complejo hexámero modular en forma de roseta denominado celulosa sintasa, que se localiza en la membrana plasmática (Delmer y Amor, 1995; Kimura, et al., 1999). En *A. thaliana* la familia de celulosa sintasas está formada por 10 genes, que se expresan en diferentes tejidos y tipos celulares (Arioli et al., 1998).

Las hemicelulosas son polímeros integrados por asociaciones de xilanas, mananas, gluco y galactomananas, o de β -glucanos (1 \rightarrow 3) y (1 \rightarrow 4) que presentan fuertes uniones no covalentes con la celulosa (Fig 1). Por ello, la red celulosa-xiloglucanos es la mayor estructura de sostén de la pared primaria, y participa en el mantenimiento de sus propiedades mecánicas (Cosgrove, 1997).

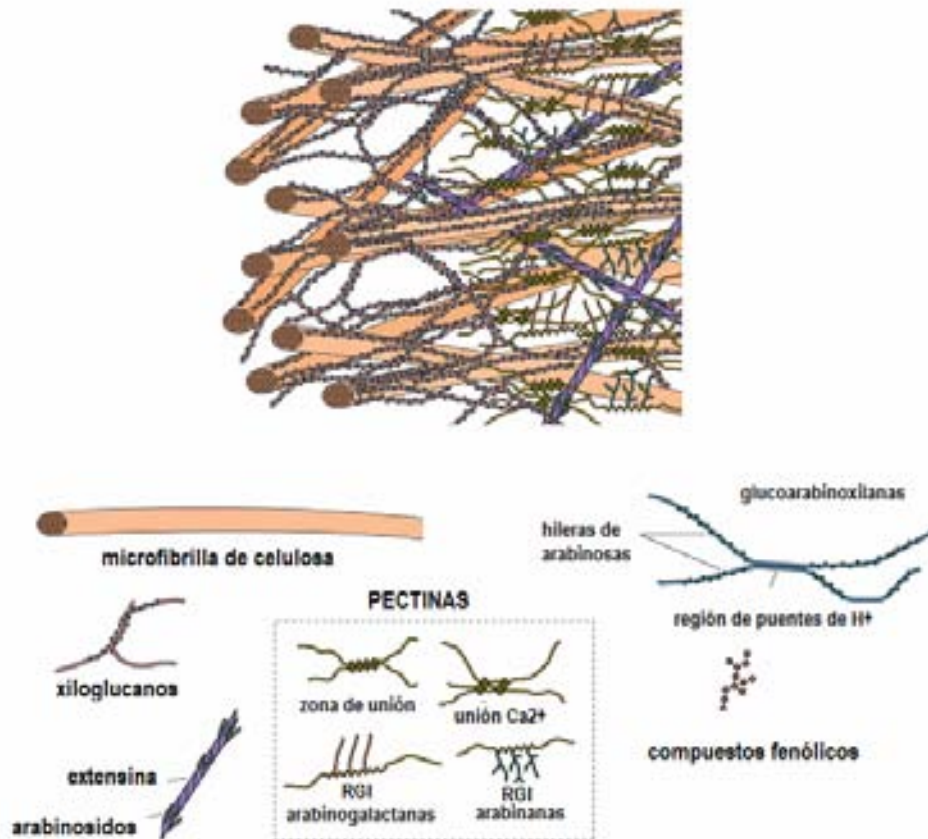


Fig. 1. Modelo en que se ilustra el arreglo de polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos de la pared celular vegetal.

Los xiloglucanos constituyen hasta el 20% de la pared primaria de dicotiledóneas y son el componente mayoritario en paredes de almacenamiento de algunas semillas (Hayashi, 1989). La composición y arreglo de las hemicelulosas difiere entre pared primaria y secundaria (Fry, 1988). La calosa ($\beta 1 \rightarrow 3$ glucano) es una hemicelulosa especializada, que restringe su ubicación a tubos cribosos del floema, microesporas, tubo polínico y superficie de estigmas incompatibles (York et al., 1990). Por otra parte, los xilanos constituyen hasta 20% de la pared celular de monocotiledóneas y pared secundaria de dicotiledóneas (Cosgrove, 2005).

Los polisacáridos pécticos son los componentes más diversos y complejos de la pared celular, son abundantes en la lámina media y paredes primarias jóvenes (Brett y Waldron, 1990). Se clasifican en homogalacturonanas, galacturonanas sustituidas y ramnogalacturonanas (Buchanan et al. 2000). Las homogalacturonanas (HG) son cadenas lineales de 1→4 (α -D ácido galacturónico), éstas forman pectinas cuando tienen niveles altos de metil esterificación, o ácidos pécticos si los niveles son reducidos. En conjunto llegan a constituir más del 60% del total de las sustancias pécticas de la pared primaria (Ridley et al., 2001). Las ramnogalacturonanas I están formadas por múltiples repeticiones del disacárido α -D-GalpA-(1,2)- α -L-Rhap-1, decoradas con sustituyentes arabinanas y galactanas. Las RGII resultan de la asociación de ácido galacturónico, ramnosa, arabinosa, y galactosa con azúcares raros como el ácido acérico, KDO y apiosa (Grant, 1997). Estudios bioquímicos han determinado que los residuos apiosil de la fracción RGII, forman ésteres con el boro (Mathoh et al., 1997). Además de las anteriores, existen sustancias pécticas raras como las xilogalacturonanas, localizadas en tejidos reproductivos de semilla de soya, manzana y polen de pino. Se ha propuesto que los residuos Xylp de las xilogalacturonanas, confieren protección a los tejidos, debido a que son difíciles de fragmentar por las poligalacturonasas fúngicas y (Schols et al., 1995).

Las paredes típicas de dicotiledóneas son abundantes en pectinas y hemicelulosas (Carpita y Gibeaut, 1993), mientras que las de monocotiledóneas gramináceas, contienen mayor proporción de hemicelulosas y menor de pectinas. En gramíneas, predominan las xilanas asociadas con pequeñas proporciones de xiloglucanas, y ésteres de ácido ferúlico unido a arabinoxilanas (Reiter, 1998).

1.3 Estructura

La pared celular puede estar formada por tres regiones que varían en relación al tipo de tejido. La pared primaria es la capa periférica que rodea a la célula y es característica de células metabólicamente activas (Farrokhi et al., 2006). La pared secundaria se localiza adyacente a la primaria hacia el interior de la célula, y es típica de tejidos maduros con crecimiento secundario. La lámina media es la región de unión entre una célula y sus vecinas (Cosgrove, 1997).

1.4 Uniones e interacciones entre los componentes de la pared

Cada polímero de la pared se enlaza a otros mediante uniones fuertes y lábiles, éstas últimas permiten el ajuste de la pared a los diversos requerimientos ambientales (Cosgrove, 2005). El tipo y frecuencia de los enlaces determina propiedades fisicoquímicas de la pared como la extensibilidad, plasticidad, digestibilidad y adherencia (Chapple y Carpita, 1998). Los entrecruzamientos (cross-link) son uniones entre los diferentes polímeros de la pared, que incrementan su rigidez (Iiyama, 1994; Fry et al., 1988). Las uniones más frecuentes entre polímeros se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tipos de uniones de los polímeros de la pared celular (Fry, 1995).

C O V A L E N T E S		
Nombre	residuos de unión	Ejemplo
Productos de acoplamiento oxidativo fenólico	Peroxidasa [O-O] + 2H ₂ O	Cadenas laterales feruloil de lignina Residuos tirosina de extensina

Enlaces glucosídicos	[Glc-Xil] [OH hemiacetalOH]	hemicelulosa y pectina ramnogalacturonanas
Enlaces éster	RGII-B Carboxilos-ácidos urónicos	Polisacáridos y glucoproteínas Glucoronoxilanas

NO COVALENTES

Nombre	residuos de unión	Ejemplo
Puentes de hidrógeno		Entre microfibrillas de celulosa . Microfibrillas de celulosa con hemicelulosa
Iónico	[Val, Hist] ⁺ de extensinas con AcGal ⁻	Extensinas y pectinas
Puente de Ca ²⁺	[AcGal] ⁻ Ca ²⁺ [AcGal] ⁻	Pectina-pectina

O = anillo fenólico

Los puentes de hidrógeno son interacciones no covalentes habituales entre microfibrillas de celulosa, de celulosa-hemicelulosa, o entre residuos de sustancias pécticas y hemicelulosas. Estos son parcialmente responsables de la insolubilidad de las xilanas, xiloglucanas y glucomananas en la pared. Por otra parte, es probable la formación de enlaces iónicos entre residuos de extensinas con carga positiva y de ácido galacturónico con carga negativa. Además de las anteriores, se ha propuesto la unión iónica entre pectinas mediante enlaces divalentes Ca²⁺ (Holdaway-Clarke et al., 2003).

2. Proteínas de la pared

2.1 Enzimas y agentes modificadores de la pared

Las proteínas de pared están integradas por dos grupos: las estructurales y las modificadoras de sustrato. Estas últimas incluyen proteínas catalíticas y otras como las expansinas que debilitan las uniones entre polímeros y alteran las características físicas de la pared. Ambos grupos de proteínas están involucradas en la síntesis, mantenimiento, alargamiento y degradación de la matriz extracelular vegetal (Cassab, 1998).

Las enzimas que sintetizan los componentes de la pared son de dos tipos: glucan sintasas y glucosiltransferasas (Farrokhi, et al., 2006). Las primeras son complejos multiméricos localizados en la membrana plasmática que sintetizan celulosa y calosa. La celulosa sintasa está formada por partículas hexaméricas en forma de roseta, ubicadas en la membrana plasmática (Fig. 2). *A. thaliana* contiene 10 genes *CesA* (*AtCesA1-10*) que codifican para la subunidad catalítica de este complejo y varían su expresión en pared primaria y secundaria (Taylor, et al., 2003).

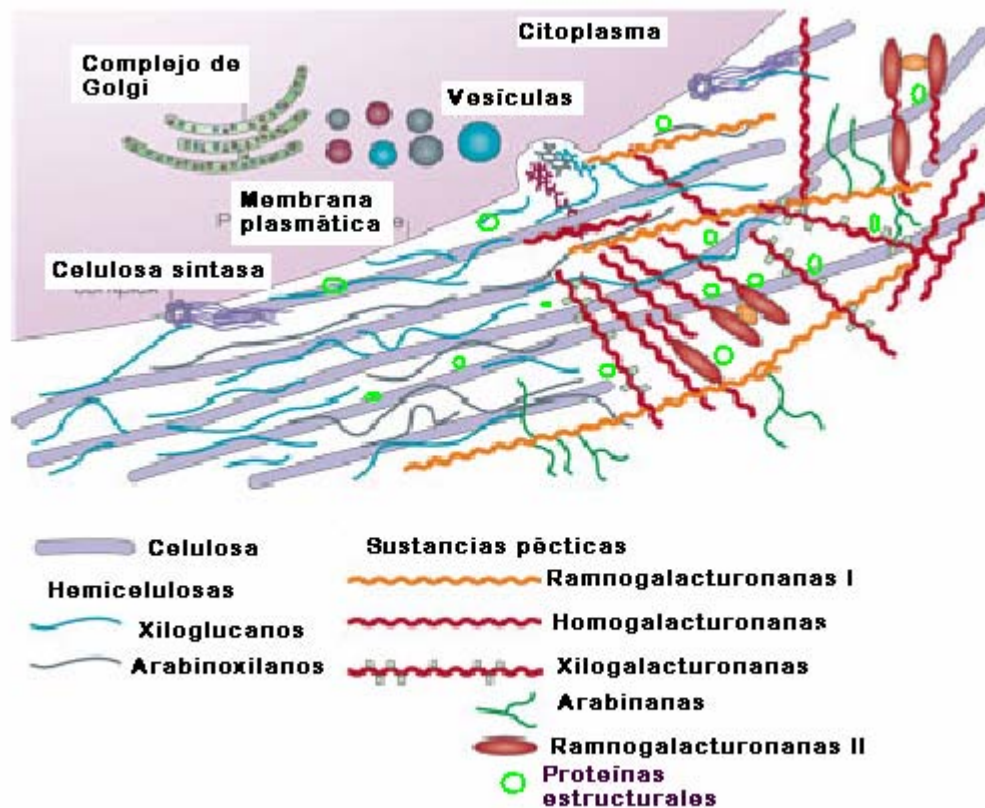


Fig. 2. Representación esquemática de los componentes subcelulares involucrados en la biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular vegetal.

Las glucosiltransferasas se localizan en el complejo de Golgi y participan en la síntesis de hemicelulosas, pectinas, mananas, y varias glicoproteínas (Richmond y Somerville, 2000). La síntesis de polisacáridos de la matriz es efectuada por genes agrupados en una superfamilia denominada celulosa sintasa like (Cs). Éstas son proteínas integrales de membrana que portan el motivo "DDDQXXRW" característico de glicosil-transferasas (Saxena y Brown, 1995). Se ha propuesto que estos complejos proteicos podrían sintetizar xilanas mananas, xiloglucanos y otros β -D-glucanos (Fig. 2).

Además de las enzimas mencionadas en el párrafo anterior, la pared celular contiene una gran variedad de peroxidadasas, hidrosasas, β -fructofuranosidasas, α -galactosidasas, β -glucoronidasas, poligalacturonasas que participan en la modificación de los polímeros de la pared (Fry, 1988) (Cuadro 2).

Cuadro No.2. Enzimas y uniones entre polímeros de la pared celular

Nombre del grupo de enzimas	Ejemplo	Acción
Glucosidasas	Ejemplo β -glucosidasa $\text{pNP-Glc} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glc} + \text{pNP}$ α xilosidasa $\text{Glc-Glc-Glc-Glc} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$ $\begin{array}{cccc} & & & \\ \text{Xil} & \text{Xil} & \text{Xil} & \text{Xil} \end{array}$	Actúan sobre residuos de polisacáridos ubicados en extremos no reductores

	$\begin{array}{cccc} \text{Glc-Glc-Glc-Glc} & + & \text{xilosa} & \\ & & & \\ \text{Xil} & \text{Xil} & \text{Xil} & \text{Xil} \end{array}$	
Endoglucanasas	Ejemplo Celulasa $(\text{Glc-Glc-Glc}^*\text{-Glc})_n + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Glc-Glc-Glc} + \text{Glc}$	Catalizan la hidrólisis de residuos intermedios de celulosa, calosa, xiloglucanas, xilanas, pectinas arabinanas, galactanas
Transglucolasas	Ejemplo: Trans- β -glucosidasa $\text{pNP-Glc} + \text{Glc-Glc} \leftrightarrow \text{pNP-Glc} + \text{Glc-Glc} + \text{Glc}$	Separan las uniones glucosídicas y las transfieren a un alcohol u otro azúcar
Pectin-meti-esterasas	Ejemplo $\begin{array}{cccc} \text{Me} & \text{Me} & \text{Me} & \text{Me} \\ & & & \\ (\text{GalA-GalA-GalA-GalA})_n & + & \text{H}_2\text{O} & \\ \rightarrow & (\text{GalA-GalA-GalA-GalA})_n & & \end{array}$	Remueven residuos grupos metilo del GalAc de las pectinas
Peroxidasas	$2\text{A}^*\text{H} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{A}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ (A* = anillo aromático)	Las peroxidasas catalizan dimerización de cadenas laterales de fenoles en polisacáridos y glicoproteínas, para formar diferulato de isoditrosina.

Los agentes debilitadores de uniones entre polisacáridos de la pared más relevantes son las expansinas, las xiloglucan endotransglucolasas/hidrosas (XTH) y los radicales hidroxilo. Las expansinas son proteínas no catalíticas relacionadas con la inducción del deslizamiento y relajación de las uniones entre polímeros (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995). Las β -expansinas, tienen 20-25% de

similitud con el grupo I de alérgenos del polen, y participan en el ablandamiento de la pared del estigma y estilo (Cosgrove, 2000).

Las enzimas endotrasglucosilasas/hidrolasas (XTH) participan en la relajación y fortalecimiento de la pared, mediante la integración y remoción de líneas de xiloglucanos que no están sólidamente unidos a la superficie de celulosa. Finalmente, los radicales OH podrían inducir la ruptura de los polisacáridos y estimular el alargamiento de la pared (Schopfer, 2001).

2.2 Características de las proteínas estructurales de pared vegetal

Las proteínas estructurales de la pared celular constituyen una familia diversa de glicoproteínas, que contienen secuencias periódicas en las que predomina el aminoácido Hyp (hidroxiprolina), por ello se conocen como HRGPs (proteínas ricas en hidroxiprolina) (Kieliszewski y Lamport, 1994). Inicialmente las HRGPs se clasificaban en extensinas, PRPs (proteínas ricas en prolina), AGPs (proteínas arabinogalactanas) y lectinas de solánaceas (Showalter, 1993). Sin embargo la caracterización molecular de las HRGPs ha mostrado recientemente, varias que corresponden a proteínas quiméricas, pues portan variaciones de dominios típicos de cualquiera de los integrantes de la familia, asociados con otros de diversa índole (Carpita et al., 1996; Cassab, 1998; Showalter, 2001). Además existen otras HRGPs, que no contienen secuencias características de ninguno de estos grupos, sin embargo presentan altos niveles de Pro o Hyp, o tienen alguna semejanza con integrantes de esa familia. Las HRGPs son glicoproteínas con niveles de glucosilación que oscilan del 1% al 98% del peso del péptido. La O-arabinosilación ocurre generalmente en los bloques de tetrahidroxiprolina, mientras que la O-galactosilación sucede en los residuos de Ser. Debido a que muchas HRGPs tienen abundantes secuencias glucosiladas, se ha sugerido que

la fracción de azúcares es importante en el doblado, solubilidad y mantenimiento de algunas propiedades de reconocimiento de las HRGPs (Stafstrom y Staehelin 1986; Kieliszewski y Shpak, 2001; Lamport, 2001).

La hidroxilación, glucosilación y entrecruzamiento son características postraduccionales, que contribuyen a las propiedades de autoensamblaje, extensión y asociación de las HRGPs con otros componentes de la pared celular (Kieliszewski y Lamport, 1994).

Además de las HRGPs, existen otras proteínas en la pared como las tioninas, polipéptidos ricos en cisteína, con actividad antimicrobiana (Varner y Lin, 1989; Wu et al., 1993). Las WAKS (cell wall-associated kinases) y la elusina son cinasas localizadas en la interfase membrana-pared celular, involucradas en procesos de señalización (Gens et al., 1999; Humphrey et al., 2007).

2.3 Extensinas

Las extensinas son proteínas estructurales frecuentes en plantas vasculares, pero también se han determinado en *Chlamydomonas*, y *Volvox* (Ertl et al., 1992). Contienen hasta 40% de Hyp y una gran proporción de His por ello son proteínas básicas con punto isoeléctrico cercano a 10 (Tierney y Varner, 1987). Su estructura primaria típica, presenta repeticiones del pentapéptido Ser(Hyp)₄ asociado a Val, Ser Thr, Lys y Tyr, aminoácidos que constituyen hasta el 50% de peso de las extensinas (Keller, 1993). Las extensinas asumen la estructura de hélice de poliprolina II, y tienen apariencia de rodillo en el microscopio electrónico, por ello se les ha atribuido función estructural (Cassab y Varner, 1988). Asimismo, son las proteínas estructurales más abundantes de dicotiledóneas, y constituyen hasta el 10% de los componentes totales de la pared. Las extensinas de

monocotiledóneas presentan mayores niveles de Thr y Ala y difieren en proporción, conformación y composición de las de dicotiledóneas (José-Estanyol y Puigdoménech, 1993). Éstas son secretadas como monómeros, y se incorporan a la pared mediante fuerzas iónicas, en esta condición son extraíbles con sales de calcio y litio. Posteriormente se insolubilizan en la pared por mecanismos parcialmente conocidos, como el enlace difeniléter entre tirosinas (Jackson et al, 2001). Por su carga positiva, muchas regiones de extensinas son centros potenciales de unión con ácidos urónicos de pectinas, esta posibilidad fue confirmada en el caso del algodón (Qi et al., 1995). Cabe señalar que las interacciones de extensinas con otros componentes de la pared, son notablemente influidas por cambios de pH, concentración de Ca^{2+} y boro (Fry, 1986).

La expresión de las extensinas es tejido específica, está regulada por el desarrollo y es inducida por herida, tratamiento con glutatión, ataque fúngico, viral, elicitores, estrés hídrico etc. La secreción e insolubilización de extensinas, contribuye a engrosar la pared en sitios específicos, como mecanismo de defensa (Lampert, 2001). Este proceso es mediado por la liberación de peróxido de hidrogeno y catalizado por una peroxidasa de pared. La acumulación de transcritos es más frecuente en tejidos vasculares, meristemáticos, zonas radicales y en regiones maduras del tejido de transmisión de mono y dicotiledóneas (Brisson et al., 1994). El incremento en el depósito de extensinas usualmente antecede a la lignificación, en paredes secundarias (Showalter, 1993). La presencia de extensinas también se han asociado a la organización de las microfibrillas de celulosa, estabilización de los microtúbulos corticales, restricción del crecimiento e inmovilización de patógenos (Cassab 1998). Por otra parte, algunos dominios extensina también se han localizado en membrana plasmática,

en donde podrían servir de elementos conectores a la pared (José-Estanyol y Puigdoménech, 1993).

2.4 PRPs

Las PRPs son polímeros que contienen Pro e Hyp, carecen de Ser y están pobremente glicosiladas con residuos de Ara, Glu y Gal (Cassab, 1998). Estas proteínas contienen motivos que son variaciones de la secuencia Pro-Pro-Xaa-Yaa-Lys, donde Xa corresponde a Val, His, Thr o Ala y Yaa se refiere a Tyr, Thr, Glu, o Pro. Las PRPs son más heterogéneas en composición de aminoácidos que las extensinas, con quienes llegan a compartir secuencias (Sommer-Knudsen, et al., 1998). Por su conformación tridimensional y localización en tejidos de soporte como xilema, fibras, esclereídas, epidermis, y parénquima de nódulo, se ha sugerido que su principal función es estructural. La expresión de estas proteínas en mono y dicotiledóneas es tejido específica, y está temporal y espacialmente regulada. Los niveles de PRPs se incrementan en condiciones de infección viral, fúngica, bacteriana, y en herida (Fowler et al, 1999). Debido a la posible interacción de los residuos proliil de las PRPs con sustratos fenólicos, la acumulación de estas proteínas podrían ser indicadores de sitios de nucleación previos al proceso de lignificación (José-Estanyol y Puigdoménech, 2000). Debido a la semejanza estructural de algunas regiones de las PRPs con aglutininas, se ha sugerido que podrían actuar como adhesivos (Cassab, 1998). Existen dos tipos de PRPs: unas son componentes inespecíficos de pared celular, y otras denominadas nodulinas se sintetizan en respuesta a infección por bacterias fijadoras de nitrógeno (Scheres et al., 1990).

2. 4.1 Nodulina ENOD2

Los nódulos fijadores de nitrógeno de leguminosas, expresan al inicio de la morfogénesis un grupo de proteínas denominados nodulinas tempranas (ENOD). La naturaleza química de las ENOD es diversa, por ejemplo ENOD-GRP3 de *Vicia faba* corresponde a una GRP, ENOD5 tienen homología con AGPs, mientras que ENOD3 y ENOD14 se relacionan con proteínas de transporte de metales hacia la membrana del bacterioide (Nap y Bisseling 1990). Curiosamente se ha determinado que la expresión de las ENOD no es exclusiva del nódulo, pues ENOD12 se localiza también en flores de chícharo (Scheres et al., 1990).

Entre las nodulinas más estudiadas se encuentra ENOD2, cuyo gen codifica para una proteína de 74 kDa con predominio de los pentapéptidos Pro-Pro-His-Glu-Lis y Pro-Pro-Glu-Tir-Gln. A diferencia de extensinas, tiene bajo contenido de Ser y alto de ácido glutámico. ENOD2 podría compartir secuencias con extensinas, pues es reconocida por el anticuerpo de antiextensina de soya (Bonilla et al., 1997a). Los transcritos ENOD2 se localizan en el parénquima del nódulo y en el tejido que rodea a los haces vasculares que conectan al nódulo con el cilindro central. Se ha propuesto que ENOD2, contribuye a la formación de una barrera contra la difusión del oxígeno, hecho que garantizaría el buen funcionamiento de la nitrogenasa del nódulo (Bonilla et al., 1997a).

2.5 AGPs

Las AGPs son glicoproteínas en las que predominan combinaciones de los aminoácidos Hyp Ala Ser y Thr, la fracción proteica constituye del 2 al 10% del total del polipéptido. La porción restante, está integrada por oligosacáridos abundantes en Ara y Gal (Showalter, 1993). Con base a su estructura bioquímica

las AGPs se han agrupado en clásicas y no clásicas. En el primer caso, el cDNA muestra un dominio transmembranal en el carboxilo terminal, el cual es reemplazado en la proteína madura por un sitio de unión a GPI (glicosil-fosfatidil-inositol). Se ha sugerido que este grupo de AGPs, podrían actuar como moléculas señalizadoras (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000). Por otra parte, las AGPs “no clásicas” contienen un dominio corto constituido por aminoácidos básicos, que interrumpen la secuencia Hyp Ala Ser Thr. Además carecen de la región GPI, en cambio pueden presentar un dominio rico en Cis, una o dos regiones ricas en Asp contiguas o periféricas a la secuencia Pro/Hyp Ala-Ser Thr (Schultz et al., 2000). Las AGPs no están unidas covalentemente a la pared celular, por ello su principal función no es estructural (Majewska-Sawka y Nothangel, 2000).

Las AGPs se han identificado en musgos, hepáticas, gimnospermas y en hojas, tallos, raíces, semillas y partes florales de angiospermas, en donde participan en procesos de crecimiento y desarrollo. Estas proteínas se han relacionado con procesos de diferenciación, desarrollo, expansión, proliferación celular, señalización, embriogénesis somática, control del balance hídrico y adhesión (Seifert y Roberts 2007). Una propiedad distintiva de las AGPs es su interacción con el reactivo de Yariv, con el cual forman complejos que se tiñen de naranja o rojo (Roy et al., 1998).

2.6 Otras proteínas estructurales de la pared

Las lectinas de solanáceas son proteínas estructurales caracterizadas por su unión específica a oligómeros de N-acetilglucosamina. Se ha propuesto que las lectinas intervienen en la defensa, interacción célula-célula, transporte de

azúcares, estabilización de proteínas de almacenamiento, control de la división celular y reparación de heridas (Showalter, 1993).

Las GRPs (proteínas ricas en glicina), son proteínas de pared que contienen hasta 70% de glicina organizada en secuencias con predominio del motivo Gli-X, (X puede ser Ala o Ser), asociado con His, Val, Glu, y Tir. Las GRPs son proteínas altamente flexibles, que podrían actuar en la interacción proteína-proteína o como agente aglutinante (Sachetto-Martins et al., 2000).

3. Interacción entre componentes de la matriz extracelular de tejidos

Sexuales

3.1 Generalidades

La matriz extracelular de tejidos sexuales de antofitas, es esencial para la adhesión del polen, la conducción de las células espermáticas, y la fertilización exitosa (Wu et al., 2001). El primer contacto del polen con el pistilo ocurre en el estigma, sitio que proporciona el ambiente apropiado para la captura, recepción, selección e hidratación del polen. Con base a la presencia de secreciones los estigmas se clasifican en secos y húmedos (Erbar 2003). Ejemplos del primer caso ocurren en *Brassica* y *Arabidopsis*, cuya epidermis está compuesta de células papilares especializadas, que interactúan directamente con el polen. En estas especies la ausencia de secreciones es complementada por componentes bioquímicos de la exina, que participan activamente en la captura y adhesión (Elleman et al., 1992). Los estigmas húmedos secretan exudados acuosos o lipídicos ricos en fenoles, enzimas, proteínas, glicoproteínas y polisacáridos. Éstos facilitan la adhesión, e intervienen en el reconocimiento, regulación hídrica y germinación del polen (Edlund et al., 2004).

Después de la germinación, el tubo polínico crece a expensas de los componentes de la matriz extracelular del canal estilar, el cual proporciona nutrientes, orientación, adhesión y defensa contra patógenos (Malhó, 1998).

Existen evidencias de señales quimiotrópicas provenientes de las sinérgidas, que nutren y guían al tubo polínico al sitio de la fecundación (Geitmann y Palanivelu, 2007). Después de la penetración en el ovario, el tubo polínico crece a través de la superficie placentar la cual es rica en secreciones. En esta región la elongación parece ser guiada por el obturador, protuberancia placentar que recubre el micropilo ovular (Herrero y Hormaza, 1996).

3.2 Proteínas estructurales de gineceo

Los tejidos sexuales de mono y dicotiledóneas contienen altos niveles de de HRGPs, muchas de ellas han sido identificadas mediante anticuerpos, y otras por ensayos colorimétricos, sin embargo pocas se han caracterizado molecularmente (Lampport, 2001; Wu et al., 2001). El aislamiento y purificación de HRGPs, es difícil pues presentan varias glicofomas relacionadas entre sí, además se asocian intensamente a otras especies moleculares con las que a menudo copurifican (Sommer-Knudsen et al., 1998).

En general las HRGP de tejidos sexuales, son glicoproteínas menores a 300 kDa con niveles de glucosilación superiores al 30%. Su estructura química es heterogénea, y frecuentemente solo una región de la proteína corresponde a motivos "tipo" HRGPs, como variaciones de la secuencia $X(\text{Pro})_3$ y $(\text{Ser-Pro})_x$, en sustitución de Ser-Hyp_4 , de extensinas o PRPs (Wheeler, et al., 2007). De igual forma, son abundantes aquellas relacionadas con AGPs, que portan variaciones del motivo Ala-Hyp-X (Showalter, 2001). Además de la función estructural las HRGPs de tejidos sexuales, participan en el reconocimiento, señalización,

nutrición del tubo polínico, control del desarrollo, balance hídrico, respuesta a herida y defensa entre otros procesos (José-Estanyol y Puigdoménech, 2000). La mayoría de las HRGPs de estructuras sexuales, se han aislado del tejido de transmisión del estilo, o de regiones vecinas al sitio de tránsito del tubo polínico (Boavida et al 2005). Sin embargo las proteínas TTS, 120 kDa y PLPIII que contienen regiones semejantes a AGPs, se expresan tanto en el tubo polínico como en el tejido de transmisión. Lo anterior demuestra la complementariedad e interacción bioquímica entre ambas estructuras (Lind., et al., 1994; Wu et al., 1995; Schultz et al., 1998; Bosch et al., 2001). A continuación se exponen algunas de las características más relevantes de las HRGPs del pistilo.

El gene *pt11* tiene una extensión de 351 pb, y codifica para una proteína con peso molecular de 11.6 kDa, y dos repeticiones de los motivos X(Pro) y Lis (Pro)₂. El transcrito de 0.6 kb se expresa específicamente en el tejido de transmisión de *Antirrhinum*. *Pt11* es 47% similar al gene tipo extensina de la matriz extracelular del cigoto de *Chlamydomonas reinhardtii*, lo que apoya la posibilidad de que ambos genes provengan de una HRGP ancestral. Se ha propuesto que la proteína contribuye al mantenimiento de las características de soporte del pistilo sin reducir su plasticidad, lo que favorecería el crecimiento simultáneo de numerosos tubos polínicos (Baldwin et al., 1992).

El gene *sts14* aislado del gineceo de *Solanum tuberosum*, codifica para una proteína de 214 aminoácidos con peso molecular de 24 kDa y pI de 8.6. Éste contiene un dominio formado por repeticiones Tir-Ile y otro constituido por una franja de 7 residuos de Pro. El polipéptido tiene 49% de identidad con la proteína PR-1 de tabaco, pues ambas comparten una región de alta homología en el C-terminal. A diferencia de PR-1, la expresión de la proteína *sts14* no es estimulada

por elicitores de patógenos. Se ha sugerido que *sts14*, podría participar en procesos de defensa y conducción de tubos polínicos. Los transcritos *sts14*, se expresan durante el desarrollo del pistilo de *Solanum tuberosum* y no se localizan ni en tabaco ni *Petunia* (van Eldik et al., 1995).

La secuencia genómica *NaPRP3g12* codifica para un péptido de 151 aminoácidos, con peso molecular de 15.64 kDa que contiene 29.8% de Pro, 17.2% de Ser, 7.9% Leu y 6.6% de Ala. *NaPRP3* se expresa intensamente en células del tejido de transmisión de *N. alata*, y no es inducido por herida. Además de su función estructural, *NaPRP3* podría participar en procesos de defensa (Chen et al, 1992). Por otra parte el gene *NAPRP4* aislado de *N. alata*, codifica para una proteína con dos dominios, el N-terminal, es rico en Pro y contiene varias repeticiones del triplete Lis-Pro-Pro, mientras que el C-terminal, presenta un péptido señal y dos regiones con residuos de His. La proteína está formada por 18.5% de Pro y 13.3% de Lis, su pI es de 10.48. *NAPRP4* codifica para la proteína GaRSGP la cual es 97% idéntica a TTS-1 de *N. tabacum*, pero contiene 13% más Gal, y no presenta Ac Glu. GaRSGP se localiza en la pared celular del tejido de transmisión, por tanto no está en contacto con el tubo polínico. Se ha propuesto que GaRSGP es una proteína estructural de posible unión a iones metálicos divalentes, propiedad que no ha sido reportada para otra HRGPs (Sommer-Knudsen et al., 1996).

Las AGPs son las glicoproteínas de antofitas mejor descritas, constituyen hasta el 9% (w/w) de la proteína total, extraíble del tejido de transmisión de *N. tabacum* (Schultz et al., 1998). Aparentemente las propiedades aglutinantes de las AGPs favorecen la adhesión entre polen y estigma. Además contribuyen a la

nutrición y construcción del tubo polínico, al proporcionar precursores de han sido identificadas e inmunolocalizadas por medio de anticuerpos (Cuadro 3).

Cuadro No.3. Determinación de AGPs en distintas especies de plantas mediante anticuerpos.

Especie	Localización	Anticuerpo
<i>Beta vulgaris</i> ¹	Antera (membrana plasmática célula vegetativa del polen)	MAC207
<i>Pisum sativum</i> ²	Célula vegetativa del polen; tegumento de células embrionarias	MAC207
<i>Brassica napus</i> ³	Endotecio, tapete, microespora, células vegetativa y espermáticas del polen	JIM8
<i>Nicotiana tabacum</i> ⁴	Polen, célula generativa y tubo polínico	JIM8, MAC207
<i>Lilium. longiflorum</i> ⁵	Tubo polínico, tejido de transmisión	JIM13; LM2
<i>Amaranthus hypochondriacus</i> ⁶	Células nucelares, micropilo, sinérgida, suspensor	JIM8, MAC207
<i>Lycopersicum esculatum</i> ⁷	Tejido de transmisión	PAP

¹ Pennell et al., 1989; ²Pennell et al.,1990; ³Pennell et al.,1991; ⁴Li et al., 1995; ⁵Jauh et al., 1996; ⁶Coimbra y Salema., 1997; ⁷ Gao et al., 1999.

Una de las primeras AGPs caracterizadas molecularmente, fue la proteína híbrida de 120 kDa, localizada en estilos de *Nicotiana alata*. Ésta es codificada por el gene NaPRP5 y tiene semejanzas con los cDNAs pMG15 y pMG08 de *N. tabacum*. Se asemeja a extensinas en la proporción de Hyp/Pro (la tercera parte del 65% del total de la proteína) y en su pl básico. También comparte

características con AGPs, pues es altamente soluble en amortiguadores acuosos pero no reacciona con el reactivo de Yariv (Lind et al., 1994). Muestra 57% de identidad con el extremo carboxilo de GaRSGP y ambas presentan una región antigénica común. La proteína de 120 kDa, puede incorporarse al citosol de tubos polínicos en crecimiento *in vivo*. (Schultz et al., 1997). Además es similar en carga y propiedades químicas a aglutininas de tabaco, por ello podría participar en el reconocimiento y nutrimento del tubo polínico (Lind et al., 1994). Asimismo, la proteína de 120 kDa interviene en el proceso de autoincompatibilidad esporofítica (Hancock, 2005).

El gen *AGPNa1* codifica para una proteína de 132 aminoácidos cuyo N-terminal contiene un péptido señal, seguido de una secuencia central con residuos Hyp/Pro. En el C-terminal presenta una región hidrofóbica parecida a una hélice transmembranal, típica de AGPs. Se expresa en matriz extracelular de estilos y en hoja (Du et al., 1994). Por otra parte el gene homólogo *AGPNa3*, codifica para una AGP no clásica de 145 residuos constituida de tres dominios. En el N-terminal porta un péptido señal, seguido de una región abundante en Pro, y en el C-terminal un dominio rico en Cis, no homólogo al de lectinas de solanáceas. Los transcritos *AGPNa3* son abundantes en estigmas de *Nicotiana glauca*. (Du et al., 1996).

Los genes *PLPs* (pistil-specific extensin-like proteins) codifican para proteínas ricas en Pro-Ser-Val-Lis, su contenido de Tyr es bajo, ello sugiere que no están insolubilizadas en la pared. El N-terminal contiene un dominio rico en Pro, y el C-terminal muestra residuos de Cis, por ello tiene homología con TTS y con la proteína de 120 kDa, pero no es reconocida por el reactivo de Yariv (Goldman et al., 1992). *PLP*II pueden traslocarse de manera casi total, desde la

matriz extracelular del tejido de transmisión, hacia la pared interna y tapones de calosa del tubo polínico, en este último sitio la proteína se expresa con gran intensidad. Se ha sugerido que PLPII está involucrada en el desarrollo de las características semisólidas del tejido de transmisión y puede tener alguna función en la capa de calosa (de Graaf et al., 2003). *PLPIII* forma parte del grupo de genes modificadores que participan en el rechazo del polen en la respuesta autoincompatible (Goldraij et al., 2006).

La AGP de tejidos sexuales vegetales mejor descrita a nivel molecular, es la proteína TTS (transmitting tissue-specific protein), que se localiza en el tejido de transmisión de *Nicotiana. sylvestris* y *N. alata*. En el N-terminal presenta un dominio rico en Pro y en el C-terminal seis residuos de Cis. La forma glicosilada de TTS tiene peso molecular de 105 kDa, sin embargo estas proteínas puede ser deglicosiladas en el canal estilar hasta alcanzar 28kDa y servir de nutrientes al tubo polínico en crecimiento. Estas proteínas reaccionan con el reactivo de Yariv y con el anticuerpo monoclonal JIM13 (Cheung, 1995). TTS tiende a oligomerizar, por ello se le han atribuido propiedades adhesivas. Además, la incorporación de proteínas TTS al medio de germinación *in vitro* incrementa el índice de elongación del tubo. Por tal razón, la reducción en el suministro de proteínas TTS afecta la fertilidad. Lo anterior fue comprobado usando plantas transgénicas con niveles reducidos de expresión de estas proteínas (Wu et al., 2000).

3.3 Proteínas estructurales de androceo

Aunque los estambres del androceo contienen altos niveles de Hyp, el número de genes semejantes a HRGPs caracterizados molecularmente al presente, es aún menor que en el pistilo (Sommer-Knudsen et al., 1998). En

estambres, no se han descrito proteínas con secuencias semejantes a las de extensinas típicas. En cambio, predominan las que contienen niveles variables de Pro, asociada a secuencias ricas en Gly y Ala, algunas de ellas muestran semejanzas con aglutininas (de Oliveira et al., 1993). No se han descrito HRGPs comunes entre androceo y gineceo, ni entre anteras y polen. A continuación se describen algunas proteínas del androceo que presentan similitudes con HRGPs.

De la inflorescencia masculina de girasol se aislaron cuatro cDNAs, dos corresponden a genes cuyos transcritos se expresan en la epidermis de la antera, durante el desarrollo tardío y en la madurez. La proteína representada en la clona SF2 codifica para un polipéptido de 121 aminoácidos con 11% de Pro, 11% de Lys y 9 % de Cys. La secuencia no tiene semejanza con otras HRGPs, tioninas o lectinas a pesar de presentar Cys. Por su alto nivel de Lys se ha sugerido su unión con ácidos urónicos de pectinas. La proteína de la clona homóloga SF1 contiene la inserción adicional de dos residuos de Pro, se ha propuesto que ambas pertenecen a una familia multigénica, sin embargo se desconoce su función (Evrard et al., 1991).

De una librería de espigas de maíz se aislaron cinco clonas, la MFS18 codifica para una proteína básica de 12 kDa, que contiene una región rica en aminoácidos hidrofóbicos, seguida por otra con cuatro residuos Thr, y en el C-terminal un fragmento con alto contenido en Pro, Gly y Ser. Los transcritos MFS18 se acumulan desde el inicio del desarrollo de la espiga, hasta la madurez del polen. El arreglo repetitivo de los residuos y la característica hidrofóbica del N-terminal, sugieren que la proteína tiene función estructural, en la pared celular de glumas, lema y palea de maíz (Wright et al., 1993).

Por otra parte los genes *ATGRP* (*Arabidopsis thaliana*, GRP) codifican para una proteína que contiene 26.6% de Gly, 14.4% de Ala y 10.0% de Pro. Las proteínas codificadas por estos genes, podrían participar en la estabilización de los glóbulos de lípidos del “pollenkit”, material que imparte color, aroma y propicia la adhesión de los granos de polen. Los transcritos se expresan en anteras durante el desarrollo tardío de la flor, y degeneran antes de la apertura del botón. Los tres genes tienen hasta 70% de homología entre ellos, lo que sugiere un origen genético común (de Oliveira et al., 1993).

Los genes APG (anther-specific de *Arabidopsis*) codifican para un péptido de 58 kDa con 55% de Pro, por otra parte, sus homólogos *CEX1* y *CEX6* de *Brassica napus*, muestran 71% de identidad con los genes APG, hecho que los relaciona con una posible familia multigénica. Los genes APG de *A.thaliana* y los homólogos de *B. napus*, son antera “específicos” y ostentan un patrón de expresión único tanto en células gametofíticas, como esporofíticas durante la gametogénesis. La expresión de APG se incrementa durante el desarrollo de la microespora y declina en la maduración del polen, además está regulada de manera diferencial en el tapete, estonio y pared de la antera del gametofito (Roberts et al., 1993).

Otro gen con secuencias ricas en Pro, es *RA8* aislado de la pared celular de anteras de *Oryza sativa* L. La proteína incluye el motivo tipo extensina SPPPPPP, que también ha sido descrito para maíz, además porta una región rica en Gly próxima al carboxilo terminal. El 22% de la proteína contiene Ala y Pro, la secuencia de aminoácidos no presenta homología con ninguna proteína conocida. *RA8* podría coadyuvar a la dehiscencia, pues se ha localizado en las bandas fibrosas de la pared celular del endotecio y tejido conectivo (Jeon et al., 1999).

4. Polen y germinación

4.1 Estructura del grano de polen

El grano de polen maduro tiene una cubierta formada por tres capas, la exterior se denomina exina y contiene proteínas, compuestos aromáticos y polisacáridos embebidos en una matriz de esporolenina. La intina es la capa interior y está compuesta predominantemente por celulosa, calosa y proteínas (Heslop-Harrison, 1992). La cubierta del polen es interrumpida periódicamente por espacios denominados aperturas, que son los sitios por donde emerge el tubo polínico. Sobre la exina del polen se encuentra una capa formada por lípidos, proteínas, pigmentos y compuestos aromáticos que invaden las cavidades esculpidas de la exina (Edlund et al., 2004).

4.2 Hidratación del polen *in vivo*

Durante la hidratación del grano de polen ocurre la reorganización de la membrana plasmática y la restauración de la actividad metabólica (Taylor y Hepler, 1997). En *Arabidopsis* este proceso es favorecido por lípidos y proteínas tipo oleosinas de la exina (Zinkl et al., 1999; Edlund et al 2004). En solanáceas, los exudados lipídicos son producidos en las células de la zona secretora del estigma y liberados al pistilo en la madurez. Se ha sugerido que el transporte transcelular y simplástico de agua en el pistilo, podría ser mediado por acuaporinas. Al respecto se ha documentado, que el genoma de *Arabidopsis* tiene 35 posibles genes relacionados con acuaporinas, y algunos de ellos se expresan en el pistilo, (Ikeda, et al., 1997; Tyerman, et al., 2002; Sánchez et al., 2004).

4.3 Germinación del polen

La germinación del polen consiste en la emergencia y crecimiento del tubo polínico, en estigmas secos ésta se efectúa a través de la pared de las células papilares, mientras que en estigmas húmedos, el crecimiento sucede vía espacios intercelulares de células de la zona secretora (Erbar, 2003). En ambos casos, la penetración es posible gracias a la expansión y debilitamiento de la pared celular del estigma ocasionada por pectinasas, esterases, poligalacturonasas y expansinas (Cosgrove et al., 1997).

El polen de muchas especies germina *in vitro* en un medio que contiene calcio, boro y una fuente de carbono (Shivanna, 2003). Debido a sus ventajas experimentales, el tubo polínico es un modelo favorable para investigar procesos como la síntesis y ensamblaje de la pared celular, distribución polar de organelos, organización del citoesqueleto, formación y transporte de vesículas secretorias, endo y exocitosis, flujos y gradientes iónicos, etc. (Mascarenhas, 1993; Feijó et al., 1999; Hepler et al., 2001).

4.4 Características distintivas del tubo polínico

4.4.1 Crecimiento apical

El crecimiento del tubo polínico es un proceso restringido al ápice, en el control de la polaridad están involucradas GTPasas ROPs y fluctuaciones de Ca^{2+} asociadas a la dinámica de la actina-F (Yang, 1998; Hepler et al., 2001). También se han descrito proteínas efectoras como la PtdIns (4,5) P_2 que interviene en la regulación de la exocitosis facilitando el crecimiento apical (Hay, 1995; Yang, 1998; Lin et al., 1997; Kost, et al., 1999).

4.4.2 Distribución y movimiento de organelos

En el tubo polínico de angiospermas los organelos se distribuyen en dos zonas: clara y densa. La primera, está constituida por vesículas P derivadas del complejo de Golgi, que participan en la conducción de polisacáridos y proteínas necesarias para la biosíntesis de la nueva pared (Ferguson et al., 1998; Hepler et al., 2001). Adyacente a la zona clara, se encuentra la zona densa que contiene mitocondrias, elementos del complejo de Golgi, retículo endoplásmico y citoesqueleto así como las células vegetativa y espermáticas (Fig. 3). En algunas especies esta zona presenta tapones de calosa distribuidos a intervalos regulares a lo largo del tubo polínico, los cuales mantienen a ambas células en la región apical (Fig. 3). Generalmente el citoplasma del tubo es una capa delgada, debido a la presencia de una gran vacuola central, que ocupa una amplia región del éste (Li et al., 1996; Frankling-Tong 1999).

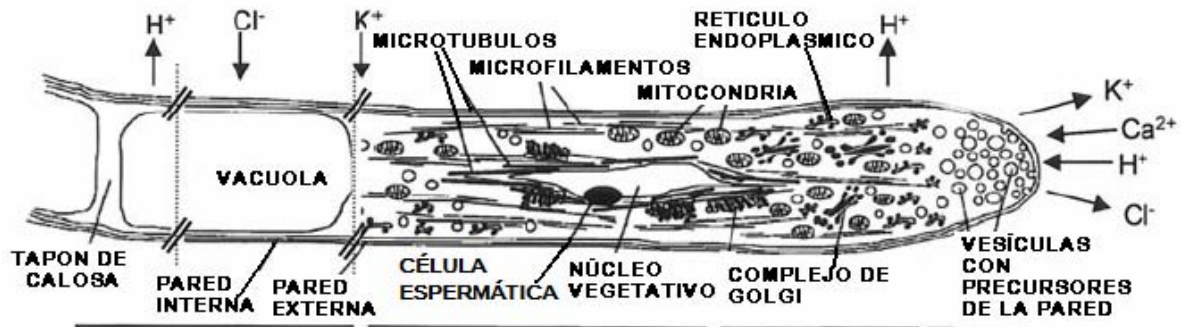


Fig. 3. Esquema que muestra la estructura subcelular y distribución de organelos del tubo polínico.

El interior del tubo polínico de angiospermas muestra corrientes citoplásmicas activas, caracterizadas por el movimiento de las vesículas P, simulando una fuente invertida. En tubos polínicos jóvenes estas corrientes alcanzan una velocidad de $10\mu\text{m sec}^{-1}$ (Heslop-Harrison y Helsop-Harrison, 1990; Feijó et al., 2004). Además, el tubo polínico presenta crecimiento pulsatorio asociado a oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} citosólico y al mantenimiento de la polaridad (Malhó y Trewavas, 1995).

El tubo polínico de algunas angiospermas puede crecer *in vivo* a velocidad hasta de 1cm/h (Mascarenhas), contrariamente en gimnospermas el crecimiento es lento, y el tubo se ramifica en varias direcciones. En *Pinus sylvestris* la mayoría de los organelos del tubo muestran movimiento azaroso, caracterizado por un desplazamiento heterogéneo de las vesículas P (de Win, et al., 1996).

Varios componentes del citoesqueleto están involucrados en el intenso movimiento intracelular que ocurre durante el crecimiento del tubo polínico (Frankling Tong, 1999). Los microtúbulos intervienen en la regulación de la translocación de la célula generativa y del núcleo vegetativo, en el crecimiento pulsatorio y en la división de la célula generativa a células espermáticas. Además, participa en la creación de la zonación de organelos, en la regulación de la morfogénesis y en el mantenimiento de la organización citoplásmica (Cai et al., 1997). El citoesqueleto de actina junto con la miosina generan las corrientes citoplásmicas de fuente invertida, características del tubo polínico de angiospermas. Además transporta las vesículas con los precursores de la pared celular al ápice, en colaboración con proteínas motoras de unión a actina (Hepler et al., 2001).

El suministro de Ca^{2+} es indispensable para el crecimiento del tubo polínico, éste ingresa al interior a través de canales localizados en la membrana plasmática del extremo apical, que pueden ser estimulados mecánicamente y por la liberación de depósitos internos (Malhó et al., 1995). La distribución del Ca^{2+} en el interior del tubo, es asimétrica pues en el ápice es de 70 veces mayor que en las regiones adyacentes (Cai, 1997). Los altos gradientes de Ca^{2+} apical median la secreción direccional de vesículas, favorecen la extensión de la membrana plasmática, y determinan la dirección de crecimiento del tubo (Palanivelu y Preuss, 2000). La concentración de Ca^{2+} también afecta el funcionamiento de numerosas enzimas dependientes de Ca^{2+} (Trewavas y Malhó, 1998). Por otra parte, el ion cloruro podría estar involucrado en la regulación del volumen celular y presión de turgor del tubo polínico (Zonia et al., 2002).

4.5 Estructura y composición de la pared del tubo polínico

La pared celular del tubo polínico constituye más del 70% de los componentes celulares. La correspondiente al ápice, se denomina primaria y la adyacente secundaria (Taylor y Hepler, 1997). Los componentes de la pared de angiospermas están organizados en dos capas, una interna contiene calosa (β 1,3 glucano), hemicelulosa y celulosa y recubre el tubo a excepción del ápice. La capa externa es fibrilar e incluye asociaciones de arabinanas con sustancias pécticas no ramificadas y pectinas ácidas con varios grados de metil-esterificación (Geitmann y Steer 2006). Las pectinas esterificadas se localizan en la pared del ápice y le confieren la plasticidad necesaria para la expansión. Por otra parte, las pectinas no esterificadas proporcionan fuerza mecánica a la pared, útil para resistir la

presión de turgor (Jauh y Lord, 1996; Li et al., 1996b).). Las pectinas son depositadas periódica y anularmente en la cubierta externa de la pared del tubo polínico, incluyendo el ápice. Esa disposición, podría contribuir al mantenimiento de la forma cilíndrica y plasticidad de la pared (Geitmann y Parre, 2004).

La calosa es el polisacárido más abundante del tubo polínico, en *Camellia japonica* constituye hasta 50% de la fracción de hemicelulosas extraíbles en DMSO (dimetil sulfoxido) (Nakamura y Suzuki, 1983). Generalmente forma depósitos o “tapones” a distancias regulares que sirven para mantener la organización de los organelos en citosol y la compartimentalización de las células espermáticas en el tubo (Rae et al., 1985; Nishikawa et al., 2005).

4.5.1 Proteínas estructurales del tubo polínico

El tubo polínico contiene un amplia diversidad de proteínas catalíticas y estructurales, muchas son sintetizadas durante la microesporogénesis, y otras se sintetizan *de novo* durante la germinación del polen (Li, et al., 1983; Mascarenhas, 1993). Las HRGPs constituyen hasta el 1.5% de los componentes de la pared en el polen, éstas se localizan en la intina y se asocian fuertemente a la capa interna de calosa del tubo polínico (Rubinstein et., al. 1995a; Rubinstein et., al., 1995b; Taylor y Hepler, 1997). Por ello una amplia fracción de HRGPs se extrae con álcali, lo que confirma su unión covalente a la pared (Li et al., 1983). El polen germinado de lirio contiene 50% más Hyp que el grano sin germinar, lo que ilustra la amplia demanda de HRGPs durante la construcción de la pared del tubo (Li et al., 1983). Las glicoproteínas NTP303 de tabaco y Pex1 de maíz, son algunas de las HRGP identificadas en polen y tubo polínico (Rubinstein et al., 1995b). El gene

Pex1 codifica para una proteína quimérica que contiene en el C-terminal un dominio tipo extensina con repeticiones del motivo Ser (Pro)₂₋₆ al que se le atribuye función estructural. Adyacente al anterior, se encuentra una región intermedia rica en Pro, seguida por un dominio globular análogo a un segmento rico en leucina (LRR) en el extremo amino, relacionado con la adhesión e interacción proteína-proteína (Stratford et al., 2001).

Por otra parte, varias AGPs se han localizado en el tubo polínico de *Nicotiana*, la inmunolocalización con los anticuerpos monoclonales (Mac 207 y JIM8) indicó que estas glicoproteínas están adheridas a lo largo de la pared de calosa del tubo polínico, exceptuando el ápice (Geitmann y Steer, 2006). Por otra parte, la adición del reactivo de Yariv a polen de lirio germinado *in vitro* alteró la depositación de calosa, pectinas y AGPS en la pared del tubo. Por ello se ha sugerido que estas proteínas participan en el mantenimiento de la morfología del ápice (Roy et al., 1998).

5. Boro

5.1 Importancia del boro en las plantas

El boro es un micronutriente esencial para diatomeas, cianobacterias, algas marinas y flageladas y plantas vasculares; su deficiencia, interrumpe el ciclo de vida de esos organismos (Loomis y Durst, 1992). El boro es absorbido por la raíz como ácido bórico (H_3BO_3 , $\text{pK}_{a1} = 5.8 \times 10^{-10}$ a 25°C). Luego se mueve hacia tallos y hojas por las corrientes de transpiración, acumulándose en los puntos de crecimiento. (Dembitsky et al., 2002).

El boro forma complejos con varias moléculas hidroxiladas y es transportado al interior de la planta, asociado al poliol que ésta utilice como fuente de carbono (Kobayashi et al., 1996). En plantas vasculares las asociaciones más comunes de B con polioles son: sorbitol-B-sorbitol (Rosaceae), manitol-B-manitol (Oleaceae, Rubiaceae y Umbellifeae) y dulcitol-B-dulcitol (Celestraceae). Cuando el B se incorpora al apoplasto, su movilidad es escasa (Hu et al., 1997).

A nivel metabólico el boro participa a) como elemento estructural de las paredes celulares, b) en el funcionamiento membranal) y c) en el metabolismo de carbohidratos y proteínas (Blazer-Grill et al., 1989). En referencia a este último aspecto, se ha sugerido que el boro podría regular el funcionamiento de algunas enzimas que contienen metales (Dembitsky et al., 2002). El requerimiento de boro entre especies es altamente variable, pues las gramíneas contienen bajos niveles mientras las plantas formadoras de látex, presentan los niveles más altos de ese micronutriente (O'Neill, et al., 1996).

La raíz y los órganos reproductores son las estructuras vegetales más sensibles al déficit de boro. En el primer caso, la deficiencia ocasiona alargamiento del ápice, hipertrofia, muerte celular y pérdida de la dominancia apical (Blevins y Lukaszewski, 1998). En órganos reproductores la carencia de boro interrumpe el desarrollo del meristemo floral, reduce la fertilidad masculina y el rendimiento de semilla (Robbertse et al., 1990b; Chen y Rerkasem, 1993).

5.2 Boro y pared celular

La pared primara y espacios intercelulares de plantas vasculares son las regiones que concentran más del 90% del boro celular (Loomis y Durst., 1992). Por ello, su deficiencia ocasiona alteraciones en la síntesis y morfología de la

pared primaria, así como en la organización de la lámina media (Kobayashi, et al., 1996). En el apoplasto el boro puede formar ésteres de borato, con los grupos hidroxilo de la apiosa y la fucosa, azúcares pertenecientes a la fracción RGII de las sustancias pécticas (Fig. 4). En plantas vasculares se ha determinado una gran incidencia del complejo B-RGII, el cual se inmunolocalizó en veinticuatro especies de mono y dicotiledóneas (Match, et al., 1993; Match, et al., 1998). Actualmente se conocen dos formas de asociación de RGII con el B, la monomérica (mRGII) y la dimérica (dRGII). La inducción de dRGII después de la adición de boro, modifica el grosor y provoca la reducción del poro de la pared de células de calabaza (Fleisher et al., 1999; Ishii, et al., 2001). Evidencias experimentales muestran que la falta de expresión del gene *NpGUT1* que codifica para una glucoroniltransferasa involucrada en la biosíntesis de RGII, produce flores estériles y desarrollo aberrante del polen y tejido transmitivo (Iwai et al., 2006).

En antofitas existe relación entre el nivel de boro y el de sustancias pécticas, por ejemplo, las gramíneas contienen tres veces menos pectinas y menos boro en comparación con dicotiledóneas (O'Neill et al., 1996).

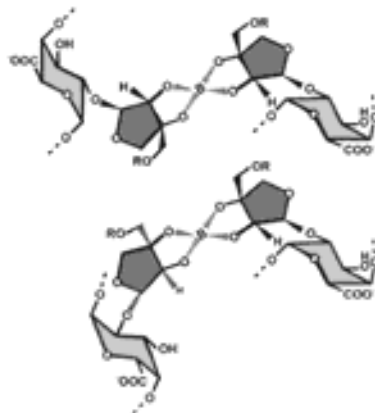


Fig. 4. Ilustración del entrecruzamiento borato-éster, que ocurre entre los grupos OH de la apiosa de la fracción RGII de la sustancias pécticas.

También se ha propuesto que el B podría unirse a grupos hidroxilo de glicoproteínas de la pared (O'Neill et al., 1996; Bonilla et al., 1997a).

Aunque el boro es importante para el mantenimiento de la integridad de la pared celular, hasta el momento no se ha precisado su mecanismo de acción (Oertli, 1993). La propuesta más sólida sugiere que las regiones RGII, podrían actuar como sitios potenciales de unión de los polisacáridos pécticos o de glicoproteínas a través de enlace B-diéster. En estos sitios, el boro organizaría la frecuencia de las intersecciones RGII en las cadenas de polisacáridos pécticos o de glicoproteínas. Por tanto la deficiencia de boro alteraría la incorporación eficiente de las pectinas o las HRGPs, a la pared celular. (Match, 1997; Bonilla et al., 1997a). Esta propuesta fue confirmada en nódulos de frijol provenientes de medio carente en boro, los cuales redujeron su tamaño y presentaron alteraciones en la morfología de la lámina media. En nódulos deficientes de dos y tres semanas disminuyó la relación Hyp/peso seco cinco y siete veces respectivamente, en referencia a los controles, así como la concentración de pectinas no esterificadas y metil-esterificadas (Bonilla et al., 1997b). Del mismo modo, podría existir relación entre los niveles de boro y de Ca^{2+} , por ejemplo la concentración de boro que induce el máximo índice de crecimiento en cultivos en suspensión de células de pino, se modifica en relación a la disponibilidad de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} del medio. Ello podría significar, que las regiones B-RGII asociadas con Ca^{2+} , actúan como queladores potenciales de sustancias pécticas (Teasdale y Richard 1990).

Observaciones relacionadas en este sentido, muestran que los iones Ca^{2+} estabilizan el complejo borato RGII en ápices de raíz, lo que apoya la función estructural del boro en la pared celular (Wimmer y Goldbach, 1999; Kobayashi et al., 1999).

En referencia al boro citoplásmico se desconocen los mecanismos particulares de acción. No obstante se ha observado alteración de procesos metabólicos como el transporte de azúcares, lignificación, metabolismo de carbohidratos, IAA y ARN, y el mantenimiento de la integridad membranal en condiciones de deficiencia (Matoh, et al., 1996; Lukaszewski et al., 1996; Cakmank y Romnheld, 1997).

5.3. Efecto de la deficiencia de boro en el tubo polínico

El requerimiento de boro en la germinación *in vitro* del polen, varía entre especies, oscilando desde las que son boro dependientes como tabaco y maíz, hasta las que pueden prescindir de él como pino e *Impatiens* sp. (Dell y Huang, 1997). La carencia de boro durante la germinación *in vitro* en especies boro dependientes, inhibe la germinación e induce la explosión temprana del tubo polínico, mientras que *Impatiens* sp., lirio y pino germinan adecuadamente, en medio deficiente. Debido a que la pared celular es la región anatómica y fisiológicamente más representativa del tubo polínico, el efecto de la carencia de boro entre ambos grupos es muy claro (Shivanna, 2003). En el polen de *Petunia* germinado *in vitro* la deficiencia de boro también alteró el funcionamiento de la membrana plasmática, sin embargo la adición gradual de ácido bórico hasta niveles óptimos, redujo la salida de iones y proteínas provenientes del citosol (Jackson, 1989). El boro también podría tener efecto quimiotrópico, pues al

depositar polen de *Petunia* sobre estilos horadados, el tubo polínico tiende sutilmente a emerger en dirección del sitio de mayor concentración de boro. Esta observación requiere una técnica experimental más clara, pero la idea es interesante (Robbertse et al., 1990a).

II. HIPOTESIS y OBJETIVOS

II.A) HIPOTESIS

a) El boro participa en el ensamblaje de las HRGPs en la pared celular del tubo polínico.

b) Las extensinas y PRPs son proteínas que proceden de polipéptidos ancestrales, por lo que comparten secuencias comunes, y algunas de estas proteínas se expresarán de forma inespecífica en tejidos sexuales de varias especies de plantas.

II.B) OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del boro en la depositación de HRGPs en el tubo polínico, y estudiar la distribución de extensinas y PRPs en tejidos sexuales de plantas de distintas especies.

II.B.I) OBJETIVOS PARTICULARES

a) Determinar el efecto del boro en la germinación *in vitro* del polen de maíz, pino, tabaco, *Impatiens* sp. y lirio.

b) Determinar la relación entre la concentración de HRGPs en la pared del tubo polínico de maíz y el suministro de boro en el medio de germinación *in vitro*.

c) Explorar el efecto del boro en la estructura química de las HRGPs.

d) Determinar la relación entre la longitud del pistilo y la concentración de Hyp en maíz, tabaco e *Impatiens* sp.

e) Determinar la presencia de extensinas comunes entre polen y pistilos de tabaco, maíz e *Impatiens* sp.

f) Investigar la existencia de homólogos de la nodulina ENOD2 en pistilos de tabaco, maíz e *Impatiens* sp.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. El polen de maíz (cv. Merrit), tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Impatiens sp.*, y lirio (*Lilium sp.*) fue obtenido de plantas cultivadas en invernadero, en temperatura de 20° a 30° C. El polen de pino (*Pinus sp.*) fue colectado durante marzo y abril en Monte Casino (Huitzilac, Morelos). El polen de maíz y pino fue recolectado después de agitar vigorosamente las anteras o los conos en el interior de bolsas de papel glacine. En el caso de *Impatiens sp.*, tabaco y lirio las anteras fueron agitadas sobre cajas de Petri. Inmediatamente después de colectado, el polen se almacenó en una cámara húmeda a 4° C hasta dos horas previas a su germinación.

Porcentajes de germinación del polen. El polen de maíz, tabaco e *Impatiens sp.* fue germinado en una solución de sacarosa al 18% (p/v), 2mM de CaCl₂ en agua bidestilada y diferentes concentraciones de boro (Rubinstein et al., 1995a), a temperatura ambiente (~25°C). La concentración óptima de ácido bórico para cada especie, fue aquella en la que se obtuvieron más granos germinados: *Impatiens sp.*, 0.5 mM, maíz 1.0 mM, tabaco 1.6 mM, pino 1.66 mM y lirio 0.162 mM. El polen de pino y lirio fue germinado de acuerdo a los protocolos propuesto por de Win et al., 1996 y Park et al., 2000. Se consideró germinado el polen con longitud del tubo polínico semejante a la del grano (~98µm). Los recuentos se realizaron con un microscopio estereoscópico (Leika stereo zoom, 6 Photo). En cada caso se realizaron 20 determinaciones con 3 repeticiones.

Análisis estadístico. Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de medias mediante prueba de Tukey para los siguientes experimentos: porcentaje de germinación del polen en medio suficiente y deficiente, longitud del tubo polínico, niveles de hidroxiprolina total, distribución de hidroxiprolina en la pared celular del tubo polínico, contenidos de hidroxiprolina total de gineceos de maíz, tabaco e *Impatiens* sp. Para ello se empleo paquete estadístico SAS.

Análisis químicos

Contenido de hidroxiprolina total del polen, gineceo y androceo. Muestras de polen de *Impatiens* sp., maíz, tabaco, pino y lirio fueron deshidratadas mediante liofilización. Luego se hidrolizaron con HCl 6N a 120° C durante 3 h, el producto resultante se resuspendió en agua y se centrifugó a 12 727 g, por 5 min. En el sobrenadante se determinó colorimétricamente el contenido de Hyp_{Tot} (hidroxiprolina total), según lo propuesto por Drozd et al. (1976).

Los pistilos y androceos de maíz, tabaco e *Impatiens* sp. fueron congelados en nitrógeno líquido, triturados en mortero y liofilizados. El contenido de Hyp_{Tot} fue determinado con el procedimiento descrito previamente para el polen.

Distribución de hidroxiprolina en el tubo polínico de maíz. Para determinar la variación de la concentración de Hyp del tubo polínico dependiente de la concentración de boro del medio de germinación, se utilizó polen de maíz germinado en medio sin boro (-B) y con tres distintas concentraciones de ácido bórico: 0.5 mM, 1.0 mM = (+B), 2.0 mM.

El tubo polínico procedente de los medios anteriores (a excepción -B), fue separado del polen con un homogeneizador de tejidos, el producto resultante se

filtró por una malla de nylon con poro de 10 micras. Para corroborar que el filtrado procedía del fraccionamiento del tubo polínico se agregó azul de anilina (0.01% en 0.1M PO_4). Luego una alícuota se observó al microscopio con luz UV (Nikon, Eclipse TE 300). El filtrado se centrifugó a 7270 g durante 9 min, la pastilla resultante fue liofilizada, y posteriormente se determinó su peso seco y contenido de Hyp_{Tot} . Una fracción del liofilizado del tubo fue colocada en un homogeneizador de tejidos con 150 μl de buffer de extracción (AcNa 0.1% pH 5, 0.1mM DTT) a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 3 min a 7270 g y se evaluó el contenido de proteína en el sobrenadante (Bradford, 1976). Otra alícuota de éste último se hidrolizó, resuspendió y evaluó colorimétricamente (Hyp_{Sol}). Al precipitado del paso anterior se le adicionó una solución de CaCl_2 0.2 M y se mantuvo 12 horas a 4° C, posteriormente se centrifugó 5 min a 11 000 g. Finalmente, se calculó el peso seco del precipitado por liofilización y luego se evaluó colorimétricamente (Hyp_{Ins}).

Este mismo procedimiento fue utilizado para obtener el valor de Hyp_{Sol} e Hyp_{Ins} de los pistilos.

Electroforesis y Western blot del tubo polínico y de los pistilos. El extracto de proteínas extraíbles en solución salina de los medios -B, y +B se sometió a electroforesis en gel catiónico neutral (Thomas y Hodes, 1981) y en gel unidimensional SDS-PAGE al 12%. Un volumen de los extractos salinos -B y +B, fue hervido 6 min con buffer 2X de Laemli (1970). Posteriormente, se colocaron 4 μg de proteína por pozo en un gel de poliacrilamida al 12% y se realizó la electroforésis con un equipo Mighty Small II, Hoefer (condiciones: buffer de

corrida: 1.5 M tris pH 8.8; 50 mA, ~90 min). Las proteínas fueron reveladas con nitrato de plata mediante el siguiente protocolo. El gel se sumergió en una solución (10% etanol, ácido acético 5%) durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, el gel se transfirió a otro recipiente que contenía una solución de 0.01% de KMnO_4 por 15 min. Posteriormente, se trasladó y se mantuvo 15 min en una solución que contenía 10% etanol y 5% ácido acético, este paso se repitió dos veces. Luego se enjuagó con agua milli-Q. Acto seguido, se sumergió en una solución de AgNO_3 0.1% y se enjuagó con agua milli-Q. Para el revelado se empleó una solución compuesta de Na_4CO_3 al 8%, y formaldehído al 0.02%. La reacción se detuvo con una solución de 10% etanol, 5% ácido acético. Al finalizar este procedimiento el gel se enjuagó con agua destilada.

La transferencia se realizó en una cámara en semiseco (SemiPhor, Hoffer). Para ello, se empleó una membrana para proteínas (Hybond-C, Amershan) humedecida en un buffer (49.6 mM Tris; 384 mM glicina; 20% metanol; 0.01% SDS). La membrana fue bloqueada 1 h a 50° sumergiéndola en un buffer compuesto por BSA al 0.25% (p/v); gelatina 0.3%; (p/v) y Tween 20 en TBS (Cassab, 1993). Como anticuerpo primario se empleó uno policlonal de antiextensina de soya (Cassab y Varner, 1987) en relación 1:1300, diluido en el buffer de incubación (0.25% (p/v) BSA, 0.25% (p/v) gelatina, 0.3% (v/v) Tween 20 en TBS). Después de incubar toda la noche la membrana, se lavó tres veces 30 min, con TBS (0.9% NaCl en 20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 0.3% (v/v) Tween-20 y 0.05% NaN^3). La proteína fue expuesta por dos métodos: a) mediante un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (anti-rabbit IgG (Fc) (1:10 000) revelado con 33 μl de BCIP (phosphate/5 Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate,

Boehringer Mannheim) y 44 μ l de NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride, Boehringer Mannheim) en 9 ml de agua. b) Por quimioluminiscencia con un anticuerpo secundario (anti-rabbit IgG) (1:5000) acoplado a peroxidasa de rábano (Amersham), según el protocolo del "kit" ECL (Amersham PPN 2106/8/9).

Análisis inmunocitoquímicos. El polen germinado fue fijado en FAA (formaldehído-ácido acético-etanol) y mantenido a 4° C hasta su uso. Luego se colocó en un portaobjetos previamente tratado con polilisina. Para la inmunolocalización se utilizó la técnica de oro-plata propuesta por Springall et al. (1984). Se empleó un anticuerpo primario de antiextensina de soya (Cassab y Varner, 1987) en relación 1:50 diluido en buffer de incubación (0.25% (p/v) BSA, 0.25% (p/v) gelatina, 0.3% (v/v) Tween 20 en TBS). Después de incubar toda la noche la membrana, se lavó tres veces 30 min, con TBS (0.9% NaCl en 20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 0.3% (v/v) Tween-20 y 0.05% NaN³). El anticuerpo secundario estuvo acoplado a oro coloidal en relación 1:100 (4 nm coloidal gold affini pure goat, ImmunoResearch). La reacción se reveló con plata siguiendo las instrucciones del "kit Sigma silver enhancer". Se emplearon dos controles negativos: suero preinmune y anticuerpo de antiprofilina de frijol (proporcionado por el Dr. Marco Villanueva, IBT UNAM) en relación 1:1000 y 1:50 respectivamente, diluidos en buffer de incubación. El mismo procedimiento se utilizó para inmunolocalizar PRPs con un anticuerpo anti-PRP de frijol, en relación 1:2500 (proporcionado por el Dr. Francisco Campos, IBT, UNAM). La visualización se efectuó con microscopio óptico Zeiss. Las fotografías se tomaron con rollo Kodak de 35 mm, ASA 100.

Análisis tipo Northern blot. El ARN total se extrajo de las espigas femenina y masculina de maíz, así como de gineceo y androceo de tabaco y conos masculinos de pino, cuando las plantas estaban en antesis mediante el siguiente protocolo. El tejido se sumergió en N₂ líquido, y se trituró añadiendo dos volúmenes de buffer de extracción (NaCl 0.1M, Tris pH 7.4 10mM, EDTA 1mM, SDS 1% (w/v), β-mercaptoetanol 1%) mezclándolos cuidadosamente durante 15 minutos hasta homogeneizarlos. Después de centrifugarlo a 7270 g 20 min, el sobrenadante se mezcló con un volumen de PCI (fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1) hasta eliminar la interfase. La suspensión fue centrifugada a 7270 g 20 min. Posteriormente se precipitó el ARN con una mezcla de NaOAc 3M pH 4.8 (1/10) y 2 volúmenes de etanol frío, la mezcla se incubó durante 15 min a 4°C. El precipitado se lavó con etanol al 70% en agua milli-Q estéril (v/v) y se secó al vacío. El volumen inicial se resuspendió con agua tridestilada estéril. Finalmente, el ARN fue precipitado con un vol. de LiCl 4M y se mantuvo a -20° C durante la noche. Pasado ese periodo, se centrifugó a 7279 g, se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en 250µl de agua tridestilada estéril. La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm. Después de realizar la electroforesis en gel de agarosa al 15% con formamida al 15%, el ARN fue transferido a una membrana Hybond para ácidos nucleicos embebida en solución SSC (citrato salino de sodio) 10x. La membrana se fijó con vacío, a 80°C durante 30 min. Se utilizó una sonda radiactiva ($\alpha^{32}\text{PdCTP}$) del fragmento ENOD2 de frijol (~1300 pb) clonado con los extremos Eco-Xho en el flagémido BlueScrip PSK en *E. coli* KL1-Blue. La membrana se hibridó a 65° C por 18 h en una solución de

hibridación (Na_2HPO_4 2M, pH 7.2; SDS 10%). Transcurrido el tiempo se lavó tres veces a) con una solución de SSC 2% SDS 0.1% (10 min), b) solución SSC 1% SDS 0.1% (10 min) y c) SSC, 0.1% (10 min). Posteriormente la membrana fue expuesta a una película de rayos X (Kodak).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1 Polen y su relación con el boro

IV.1.1 Efecto del boro en la germinación *in vitro* del polen de cinco especies de plantas

Para conocer el efecto del boro sobre la germinación *in vitro* de polen de pino, maíz, *Impatiens* sp., lirio y tabaco, se colocaron granos frescos de estas especies, en condiciones de suministro apropiado (+B) y en medio carente de éste (-B). El polen de maíz incrementó 14 veces el porcentaje de germinación, en +B, mientras que el de tabaco lo triplicó. Contrariamente, *Impatiens* sp., pino y lirio no mostraron diferencia significativa en el porcentaje de germinación, entre ambas condiciones (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de germinación del polen de cinco especies de plantas germinado en medio deficiente de boro (-B) o suficiente (+B). *Impatiens* sp. 0.5 mM; maíz 1.0 mM; tabaco 1.6 mM; pino 1.66 mM; lirio 0.162 mM de ácido bórico. El promedio corresponde a datos de seis repeticiones. (\pm : desviación o error estándar).

Planta	Medio suficiente +B % de germinación	Medio deficiente -B % de germinación
<i>Impatiens</i> sp.	14.7(\pm 3.9) a	13.9 (\pm 4.3) a
<i>Zea mays</i>	75.1(\pm 5.6) a	5.3 (+2.3) b
<i>Pinus</i> sp.	74.6(\pm 6.7) a	70.8 (\pm 6.9) a
<i>Nicotiana tabacum</i>	67.3(\pm 3.1) a	21.1(\pm 4.5) b
<i>Lilium longiflorum</i>	17.6(\pm 3.6) a	13.1(\pm 3.9) a

^a Valores promedio entre columnas con la misma letra son estadísticamente similares de acuerdo a la prueba de Tuckey (P<0.05).

Es interesante señalar que la mayoría de los granos de polen de maíz colocados en medio carente de boro (-B) explotaron, mientras que los de tabaco permanecieron sin cambios aparentes (resultados no mostrados). Ello sugiere que la respuesta a la disponibilidad de boro, podría variar aun entre especies +B, pues la reacción más frecuente en ambas, consiste en reducción en el porcentaje de germinación y estallamiento del tubo polínico (Shivanna, 2003). Por otra parte, en los cinco grupos de plantas, la adición de boro indujo una elongación notable del tubo polínico. En *Impatiens* sp., pino y lirio la longitud de éste se duplicó, mientras que en maíz se triplicó en referencia a los valores observados en -B (Cuadro 5).

Cuadro 5. Longitud del tubo polínico (μm) del polen de cinco especies vegetales germinado en medio deficiente de boro (-B) o medio suficiente (+B). Tiempo (h) de incubación del polen en el medio de germinación: ¹(8); ²(2); ³(24), ⁴(9), ⁵(6). (\pm : desviación o error estándar).

Planta	Medio suficiente +B longitud del tubo (μm)	Medio deficiente -B longitud del tubo (μm)
<i>Impatiens</i> sp. ¹	260.5 (\pm 53) a	128.7 (\pm 61)b
<i>Zea mays</i> ²	457.3 (\pm 64)a	130.2 (\pm 28)b
<i>Pinus</i> sp. ³	122.4 (\pm 20)a	61.5 (\pm 15)b
<i>Nicotiana tabacum</i> ⁴	624.7 (\pm 93)a	154.1 (\pm 47)b
<i>Lilium longiflorum</i> ⁵	1235.6 (\pm 234)a	704.1 (\pm 124)b

^a Valores promedio entre columnas con la misma letra son estadísticamente similares de acuerdo a la prueba de Tuckey (P<0.05).

Esta respuesta ya ha sido descrita previamente por otros investigadores (Helsop-Harrison, 1971; Cakmak y Römheld, 1997; Matoh, 1997). Algunos trabajos han señalado la importancia del suministro de concentraciones suficientes de boro en tejidos sexuales de fanerógamas, durante el proceso de fecundación. Por ejemplo, en el trigo la reducción en el rendimiento de granos de la variedad SW41 sensible a la deficiencia de boro, fue atribuida a la escasez de ese microelemento en el estigma y estilo durante la germinación *in vivo*. Esa condición, provocó disminución en la longitud del tubo e interrupción de la fecundación (Chen y Rerkasem, 1993). El boro también se ha asociado al metabolismo de carbohidratos así como al desempeño adecuado de funciones de componentes de la membrana, como la ATPasa de H⁺ (Shivanna, 2003).

IV.1.2 Distribución de hidroxiprolina en polen germinado de cinco especies de plantas.

El nivel de HRGPs de un tejido puede evaluarse indirectamente, midiendo colorimétricamente la concentración de Hyp (Cassab y Varner, 1988; Hood et al., 1991; Kieliszewski y Lamport; 1994). El polen de maíz y tabaco, especies B dependientes, contienen más Hyp_{Tot} que pino, *Impatiens* y *Lilium*. Por ejemplo los niveles de Hyp_{Tot} del polen de tabaco y de maíz, son 48% y 32% respectivamente mayores a los de pino (Cuadro 6). Sin embargo, entre maíz y lirio o maíz e *Impatiens* sp., esta diferencia apenas alcanza el 10%. Para conocer si esta característica también se presenta en otras especies, sería imprescindible realizar pruebas de germinación *in vitro*, así como la determinación del contenido de Hyp_{Tot} con otras especies, cuyo polen presente distinta demanda de boro.

Cuadro 6. Niveles de hidroxiprolina total (Hyp_{Tot}; µgHyp/mg materia seca) del polen de cinco especies vegetales. (±:desviación o error estándar).

Especie	Concentración de Hyp
<i>Impatiens</i> sp.	0.87 (±0.03)c
<i>Zea mays</i>	1.01 (±0.06)b
<i>Nicotiana tabacum</i>	1.31(±0.07)a
<i>Pinnus</i> sp.	0.68 (±0.03)d
<i>Lilium longiflorum</i>	0.89 (±0.06)c

^a Valores promedio entre especies con la misma letra son estadísticamente similares de acuerdo a la prueba de Tuckey (P<0.05).

A pesar de que la Hyp es un aminoácido poco frecuente en las proteínas, es notoria su acumulación en estructuras sexuales. Evaluaciones de Hyp_{Tot} hechas por otros autores, en distintas regiones de la planta de maíz, muestran que el polen contiene hasta cinco veces más Hyp_{Tot} que el entrenudo (0.17 µg Hyp /100mg), raíz (0.20 µg Hyp/100mg) y hoja (0.23 µg Hyp/100mg). Ello revela que el polen es una estructura de almacenamiento de Hyp, aminoácido que podría ser utilizado de forma inmediata para la síntesis de HRGPs del tubo polínico (Hood et al., 1991; Hood et al., 1993).

Rubinstein et al. (1995a) evaluaron la acumulación de Hyp_{Tot} en distintas fases de la gametogénesis del maíz. Encontraron que en las etapas más tardías de la microesporogénesis, este aminoácido se incrementa notablemente. La concentración de Hyp_{Tot} del polen de maíz, tabaco, *Impatiens*, lirio y pino en relación a otras regiones de la planta, sugiere que este aminoácido es importante durante la germinación del polen. Otros autores

reportaron que en polen de *Petunia*, la prolina, aminoácido del que se origina la Hyp, constituye 26% del peso en base seca del grano (Stanley 1971).

Para investigar la relación entre la concentración de boro y el nivel de HRGPs totales en el tubo polínico, muestras de polen de maíz fueron germinadas *in vitro* en medio con 0.5 mM, 1.0 mM y 2mM de ácido bórico, luego se separo el tubo polínico del grano y se midió la concentración total de Hyp (Cuadro 7A).

Cuadro 7. Distribución de hidroxiprolina (Hyp) en la pared celular del tubo polínico. **(A)**: HRGPs totales (Hyp_{Tot}), **(B)**: HRGPs unidas de manera no covalente (Hyp_{Ext}), **(C)**: HRGPs unidas covalentemente a la pared (Hyp_{Ins}). (\pm : desviación o error estándar).

(A)	Hidroxiprolina total (Hyp _{Tot})		
	μg hidroxiprolina/mg peso seco		
	0.5 mM H ₃ BO ₃	1.0 mM H ₃ BO ₃	2.0 mM H ₃ BO ₃
	0.53(\pm 0.03)c ^z	0.63 (\pm 0.03)a	0.63 (\pm 0.03)a
(B)	Hidroxiprolina extraíble en CaCl ₂ (Hyp _{Ext})		
	μg hidroxiprolina/ μg 0.2 M CaCl ₂		
	0.5 mM H ₃ BO ₃	1.0 mM H ₃ BO ₃	2.0 mM H ₃ BO ₃
	0.13(\pm 0.02)c	0.25 (\pm 0.03)a	0.16 (\pm 0.02)b
(C)	Hydroxiprolina (Hyp _{Ins})		
	μg hidroxiprolina/ mg peso seco		
	0.5 mM H ₃ BO ₃	1.0 mM H ₃ BO ₃	2.0 mM H ₃ BO ₃
	1.73(\pm 0.02)c	4.15 (\pm 0.03)a	2.69 (+0.03)b

^a Valores promedio entre columnas con la misma letra son estadísticamente similares de acuerdo a la prueba de Tuckey (P<0.05).

En condiciones de carencia de boro, el polen de maíz estalla o el tubo polínico es incipiente o frágil. A pesar de que 0.05 mM de boro no es la concentración óptima, el efecto sobre los valores de Hyp de la pared del tubo, es notable pues en esas condiciones se obtiene el 85% del valor máximo registrado (1.0 mM). Al aumentar la concentración de boro de 0.5 mM a 1 mM, la concentración de Hyp_{Tot} se elevó 15% sobre el valor anterior. Ello muestra que, el suministro de boro se relaciona con el incremento de HRGPs en la pared del tubo polínico de maíz. En 1.0 mM de boro el 63% de Hyp_{Tot} del polen de maíz se localizó en el tubo polínico. Ello demuestra que la mayoría de las HRGPs del grano, son empleadas en la construcción de la pared celular (Cuadro 7 A). Este valor es alto, si se considera que la longitud del tubo polínico de granos germinados *in vitro*, puede ser hasta 70% menor que la alcanzada *in vivo* (Taylor y Hepler, 1997). Dicha afirmación se ha probado experimentalmente pues, las proteínas insolubilizadas en la pared del polen de *Lilium* constituyeron el 25% de la materia seca cuando los tubos crecieron en el estilo, y solo 3.2% en aquellos germinados *in vitro* (Shivanna, 2003).

La Hyp_{Sol} corresponde a la fracción de HRGPs que no han sido unidas covalentemente a la pared. Con 0.5 mM de ácido bórico, se acumula hasta el 52% de las HRGPs extraíbles en CaCl₂, mientras que en el rango de 0.5 a 1mM la concentración se duplicó (Cuadro 7B). Evidencias experimentales previas indican que durante la germinación del polen de maíz, existe una gran demanda de proteínas extraíbles en CaCl₂. Al respecto, en un experimento donde se evaluó la concentración de proteínas extraíbles de polen germinado de maíz, se reportó que el 75% del total de HRGPs provinieron del extracto

salino (Bedinger y Edgerton, 1990). Se ha sugerido que además de su actividad estructural, el boro favorece el funcionamiento adecuado de la membrana celular y organelos relacionados con ésta (Jackson, 1989). Trabajos previos han mostrado, que la membrana del tubo polínico de *Petunia*, actúa de forma anómala cuando el polen es germinado en medio deficiente de boro. Dicha limitación es corregida, con la adición de ácido bórico hasta niveles óptimos (Blevins y Lukaszewski, 1998).

De forma similar, la concentración de Hyp_{Ins}, que corresponde a las HRGPs incorporadas covalentemente a la pared, se incrementó 42% de 0 a 0.5 mM y 58% de 0.5 a 1.0 mM (Cuadro 7C). El resultado anterior sugiere, que este microelemento también favorece la insolubilización de HRGPs en la pared celular. Actualmente se desconoce el mecanismo por el que ocurre la unión covalente de las HRGPs y su relación con el boro. Sin embargo, se ha propuesto la formación de interacciones o enlaces, entre grupos OH de glicoproteínas y boro, de forma análoga a las uniones que se establecen entre radicales OH de RGII de pectinas y boro (Loomis y Durst, 1992; Match, 1997).

IV.1.3. Inmunolocalización de extensinas y PRPs en polen germinado de maíz, tabaco, pino e *Impatiens* sp.

Debido a que las evaluaciones colorimétricas, solo proporcionaban datos de la acumulación de Hyp del polen de maíz, el siguiente objetivo fue determinar la localización de HRGPs en el polen germinado de las especies restantes, en condiciones -B y +B. En tabaco, pino e *Impatiens* sp. el tamaño del grano germinado es reducido y el tubo polínico es difícil de separar, por

esa razón se recurrió a la inmunolocalización como estimación indirecta de los niveles de HRGPs. Para implementar esta técnica, se utilizó el anticuerpo antiextensina de testa de soya que reconoce secuencias comunes a extensinas y PRPs (Bonilla et al., 1997a). En maíz germinado en +B, la señal se observa con mucha intensidad a lo largo del tubo polínico (Fig. 5B), mientras que en -B ésta se presenta en el sitio adyacente al grano, en donde estalló el tubo (Fig. 5 D). En ambos casos, la intensidad de la señal es semejante, lo que sugiere que las extensinas y PRPs son sintetizadas antes de ser ensambladas en la pared del tubo polínico. La nitidez de la señal, también puede deberse a que las proteínas del anticuerpo son más afines a los epítopes de extensinas y PRPs del tubo (Fig. 5 B, D). En el caso de tabaco germinado en +B y -B, la señal se reduce en intensidad, pero en ambas condiciones se localiza claramente en el tubo polínico (Fig. 6 B, D). En referencia a *Impatiens* sp. y pino, especies que germinan en -B, la señal fue tenue y un poco difusa respecto a maíz y tabaco (Fig.7 B, D y 8 b, D). Por ejemplo en *Impatiens* sp. la respuesta se observa solo en algunas zonas de la periferia del tubo polínico en -B y +B (Fig. 7 B, D). Por otra parte, en pino la señal se presenta como un obscurecimiento en la superficie de algunas regiones del tubo (Fig. 8 B, D).

A pesar de las diferencias en la intensidad del reconocimiento con el anticuerpo entre las especies en las inmunolocalizaciones de HRGPs, las muestras en presencia del suero preinmune, presentan poca o ninguna reacción con la tinción oro-plata.

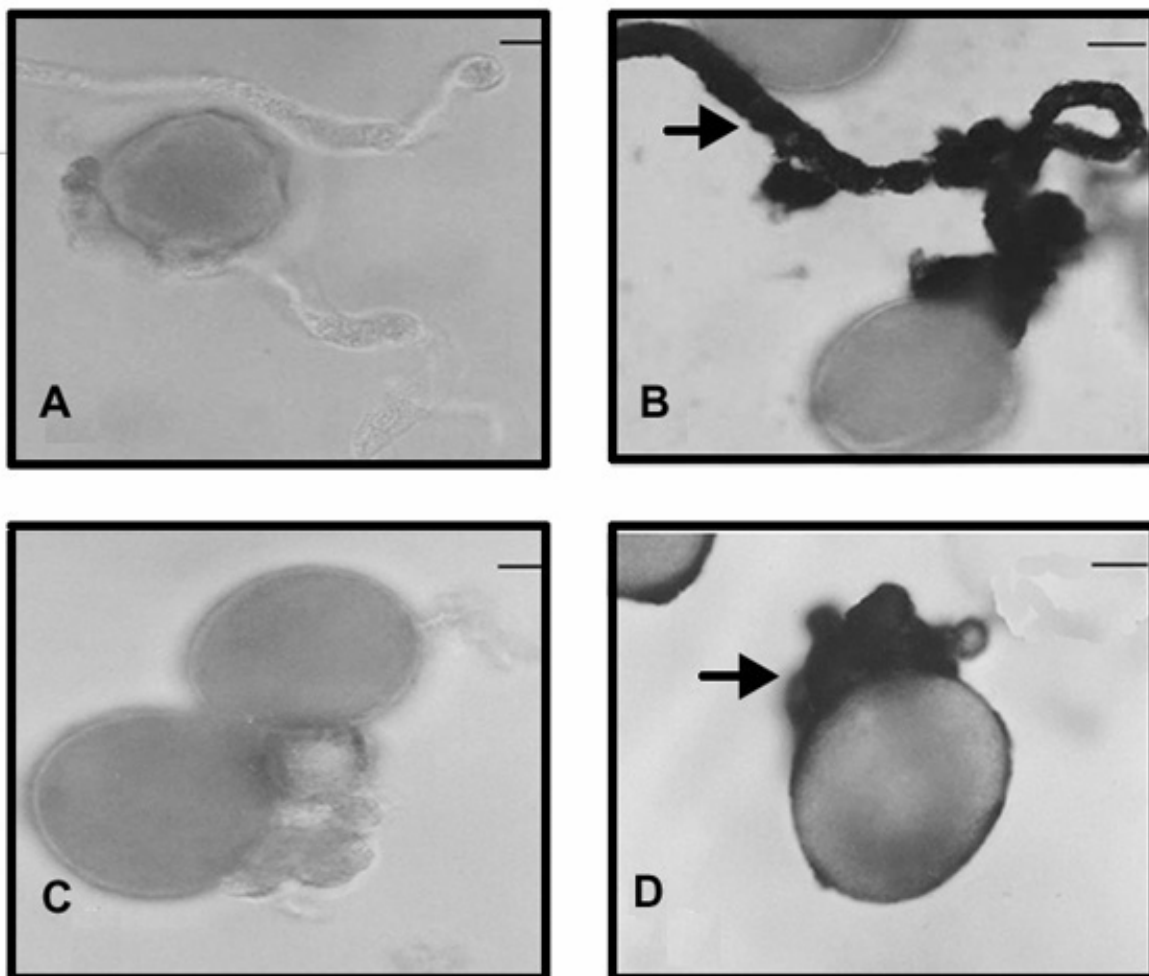


Fig. 5. Inmunolocalización de extensinas y PRPs en polen de maíz germinado en condiciones suficientes +B (A y B) y deficientes de boro -B (C y D). Después de fijadas las muestras fueron incubadas (B y D) con el anticuerpo primario antiextensina de testa de soya y con suero preinmune (A y C). El anticuerpo secundario fue anti-conejo IgG conjugado con fosfatasa alcalina. Notar que la señal se presenta en el tubo polínico en +B (B) y en la región adyacente al grano donde ocurre la ruptura (D). Barra = 911 μ m.

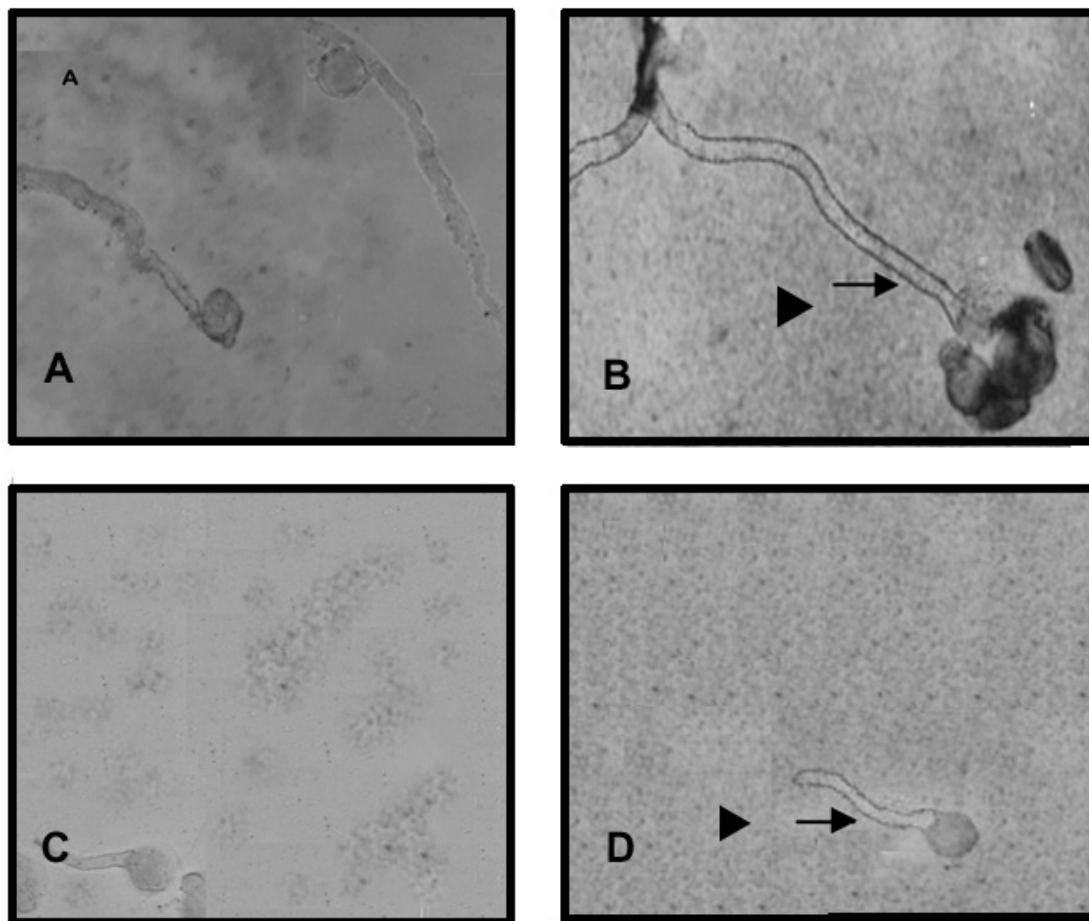


Fig. 6. Inmunodetección de extensinas y PRPs en polen de tabaco germinado en medio suplementado con boro +B (A y B) y sin boro -B (A y C). El polen germinado en ambas condiciones fue fijado y tratado con suero preinmune (A y C) y con anticuerpo primario antiextensina PRP de soya (B y D). Se utilizó un anticuerpo secundario de anti-conejo IgG conjugado con fosfatasa alcalina. La flecha indica que la señal se presentó en pared celular del tubo polínico en B y D, mientras que las muestras tratadas con suero preinmune carecen de señal. Barra = 363 μ m.

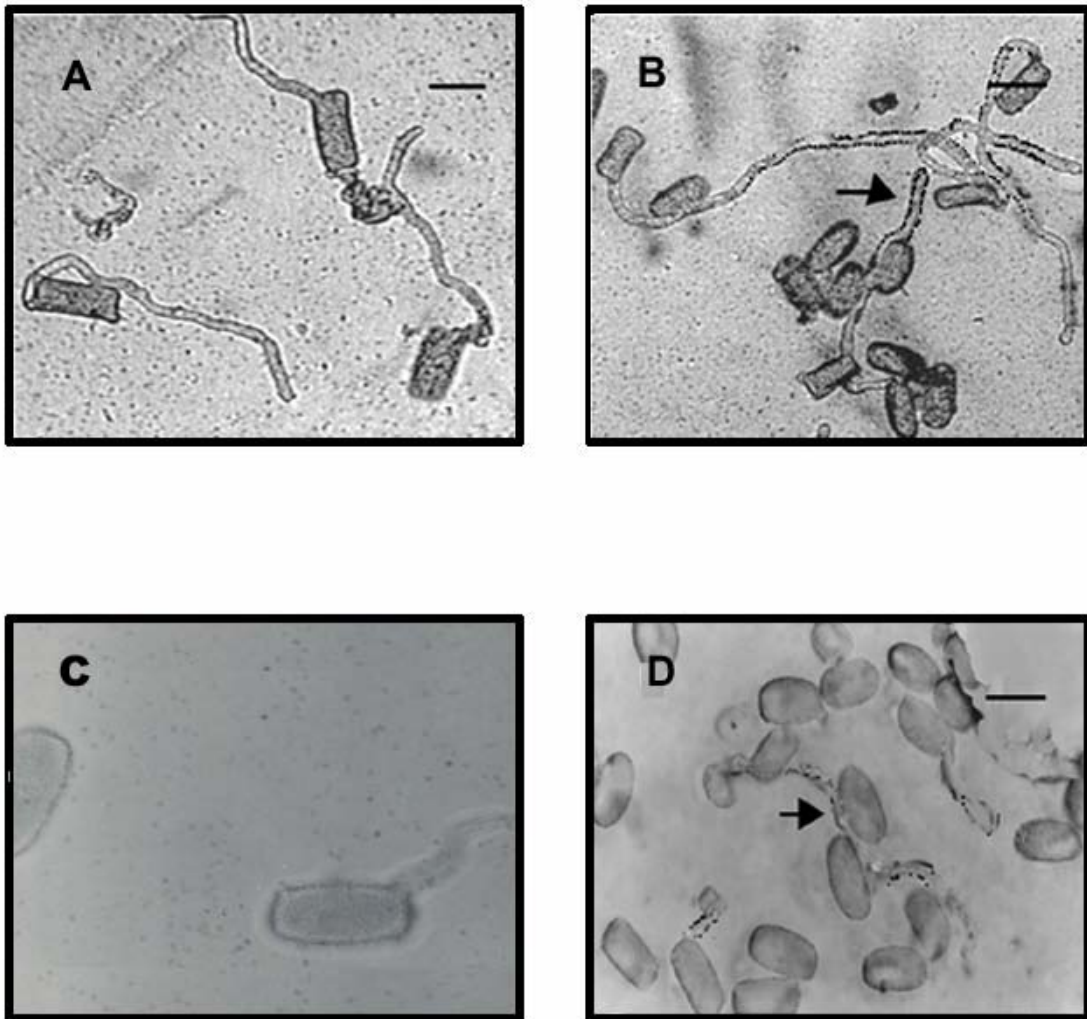


Fig. 7. Immunolocalización de extensinas y PRPs en polen de *Impatiens* revelado por el método de tinción de oro-plata coloidal
 A y B polen germinado en condiciones de suficiencia de boro (+B).
 C y D polen germinado en condiciones de deficiencia de boro (-B).
 A y C polen germinado y tratado con suero preinmune.
 B y D polen germinado y tratado con anticuerpo antiextensina de soya y PRP.
 La flecha indica que la señal se presentó heterogéneamente en la pared del tubo polínico en B y D. Barra = 911 μ m.

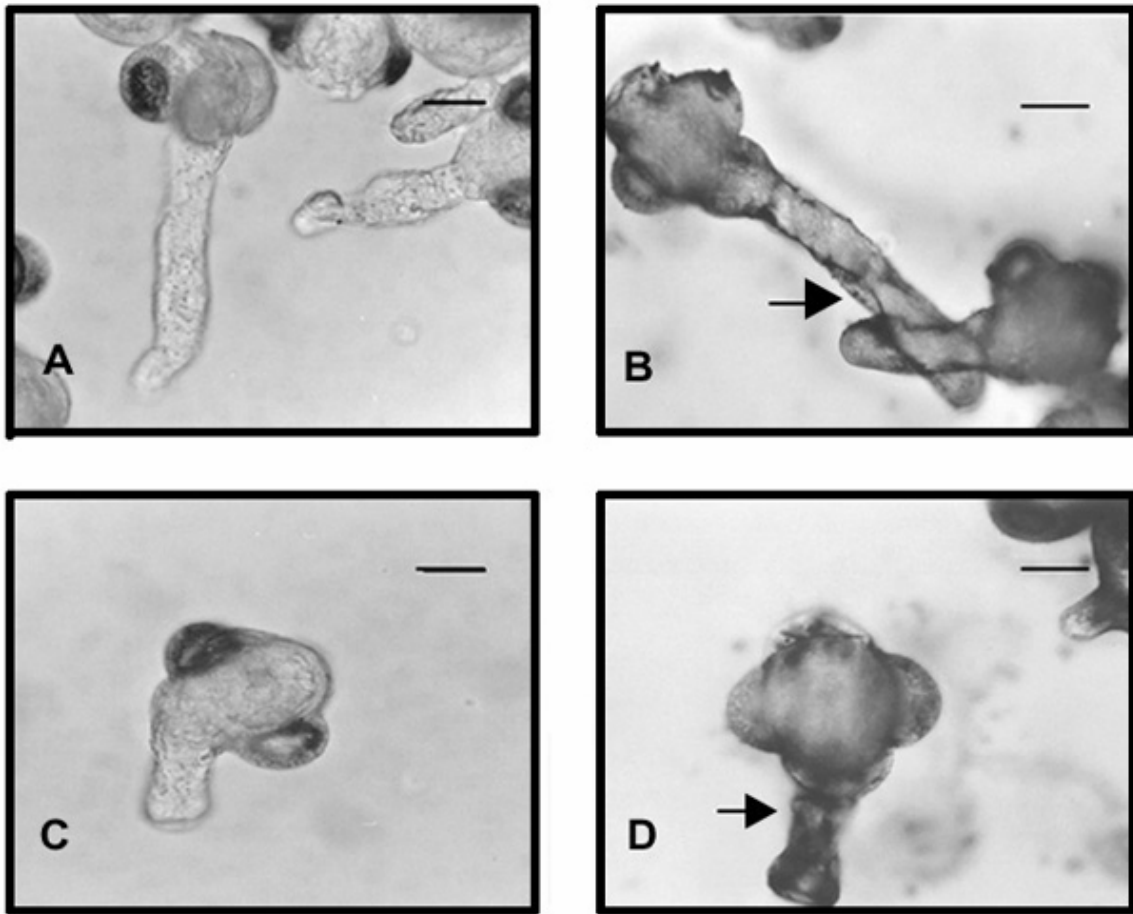


Fig. 8. Inmunodetección de extensinas y PRP en polen de pino germinado *in vitro* en condiciones de deficiencia de boro (A y C) y suficiencia (B y D). Las muestras fueron fijadas e incubadas con anticuerpo primario antiextensina de testa de soya (B y D) y con suero preinmune (A,C). Como anticuerpo secundario se usó anti-conejo IgG conjugado a fosfatasa alcalina. Barra = 911 μ m.
 Notar que la señal es difusa en la pared celular del tubo polínico (B y D), mientras que A y C, tratadas con suero preinmune carecen de señal.

La inmunolocalización como análisis cualitativo, depende ampliamente de la afinidad entre el anticuerpo y los epítopes de las proteínas existentes. No obstante, debido al tamaño de los especímenes la inmunolocalización de extensinas y PRPs fue un recurso más accesible que la cuantificación química, en el presente estudio. Los resultados de las figuras 5 a 8 (B, D) sugieren que podrían existir más HRGPs en el tubo de especies +B que en aquellas -B. Existen antecedentes de la diferencia de concentraciones de polisacáridos pécticos y la demanda de boro, entre paredes de mono y dicotiledóneas. Por ejemplo, el complejo RGII-B en dicotiledóneas, constituye hasta 5% de un gramo de pared. En cambio en monocotiledóneas sólo representa el 0.3% (O'Neill et al., 1996). Si bien, hasta el momento se desconoce la forma en que se unen las HRGPs al boro, sería interesante explorar la posibilidad de cuantificar la relación boro-HRGPs, entre especies de plantas con polen B+ y B- de forma análoga a la existente entre boro y RGII.

IV. 1.4 Análisis tipo Western blot de la fracción extraíble en CaCl_2 del tubo polínico de maíz.

Los resultados de los experimentos discutidos anteriormente, señalan que podría existir relación entre la concentración de boro y el incremento de HRGPs, pero no aclaran, el tipo de interacción entre ellos. Para determinar indirectamente, la posible modificación en la estructura de las HRGPs ocasionada por el boro, se realizó un análisis tipo Western blot con la fracción extraíble en CaCl_2 de la pared celular del tubo polínico en B+ y B- (Fig. 9).

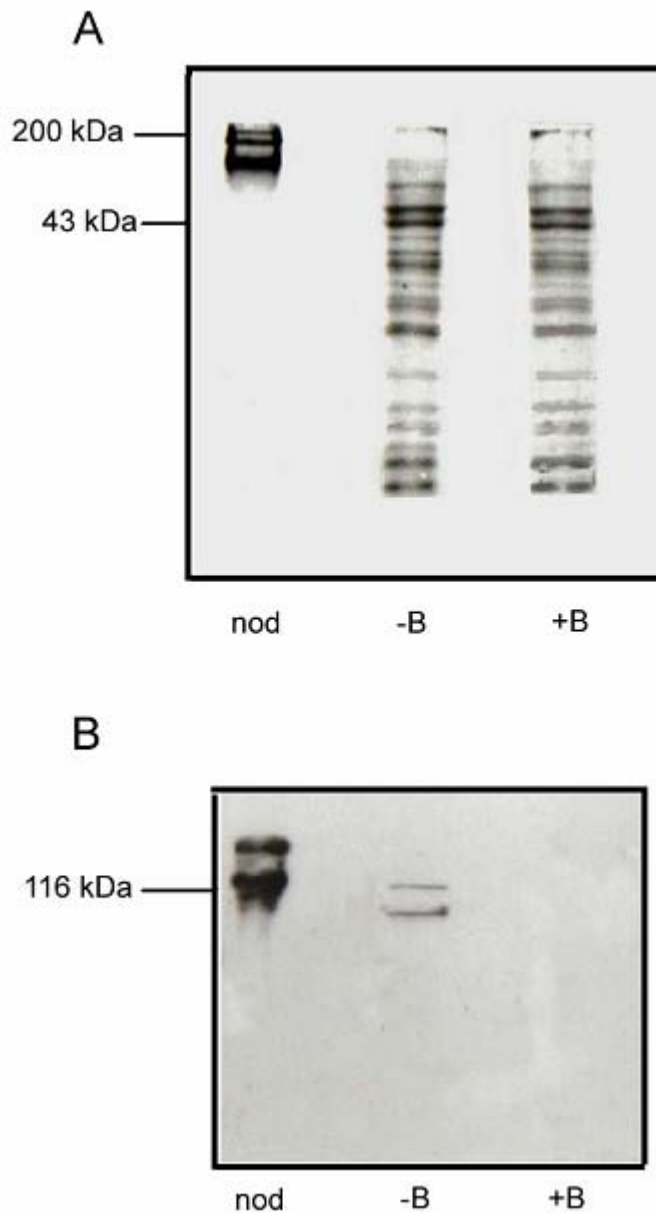


Fig. 9. Caracterización de proteínas de pared del tubo polínico de maíz extraíbles en CaCl_2 . (A) Patrón electroforético SDS-PAGE (12%) del extracto obtenido en medio suficiente +B y medio deficiente de boro -B. (B) Western blot correspondiente en que se utilizó un anticuerpo antiextensina de testa de soya. Notar la ausencia de las dos bandas correspondientes a HRGPs en +B.

En este experimento se empleó el mismo anticuerpo antiextensina de soya utilizado para las inmunolocalizaciones (Cassab et al., 1985; Cassab, 1998).

Los patrones electroforéticos de las proteínas extraídas con CaCl_2 muestran semejanza en el número y peso molecular entre proteínas en condiciones de deficiencia (-B) y suficiencia de boro (+B). Ello confirma que una amplitud de HRGPs son sintetizadas previamente antes de la germinación y que la ausencia de boro no modifica el número y peso molecular de ellas (Fig. 5D y 9 A).

En la membrana de nitrocelulosa se observaron dos bandas con peso molecular alto en -B, una de ellas podría corresponder a la proteína de 116 kDa reportada por Bonilla et al. (1997a), y otra que por su carga y conformación, quedó en el gel concentrador (Fig. 9B). Sin embargo, en presencia de concentraciones óptimas de boro (+B) no se observaron éstas bandas. Lo anterior permite sugerir que el boro induce alguna modificación en la estructura de extensinas y PRPs, de forma tal que el anticuerpo no reconoce esos nuevos epítopes (Fig. 9B) y confirma la posibilidad de una relación bioquímica entre el boro y las HRGPs.

IV.2. Otros experimentos con polen

IV.2.1 Inmunolocalización de PRPs

Existen antecedentes experimentales que sugieren la participación de las PRPs en otras funciones distintas a las estructurales. Se ha reportado que algunas proteínas bacterianas y de animales, contienen regiones ricas en Pro

que podrían considerarse elementos estructurales, asociados al reconocimiento específico de proteínas de la superficie membranal (Williamson, 1994; Cassab, 1998). Las glicoproteínas p33 y p36 se acumulan en la fracción soluble de la pared celular de *Phaseolus vulgaris* en respuesta al déficit hídrico. Ambas pueden unirse potencialmente a la superficie celular de protoplastos, junto con la proteína pmp80 de la membrana plasmática. Estas proteínas tienen homólogas en alfalfa y soya (García-Gómez et al., 2000).

La capacidad de adhesión del polen y del tubo polínico a la superficie del estigma y tejido transmitivo, indudablemente conducirá a una fertilización satisfactoria. Se ha sugerido que en plantas con estigmas secos como *Brassica* y *Arabidopsis*, la adhesión a la superficie del estigma, se relaciona con el depósito y movilización de componentes de la cubierta del polen. Éstos, promoverían la formación de algún tipo de unión a componentes del estigma. Para determinar la presencia de homólogos de p33 y p36 en el polen germinado de maíz y tabaco se efectuaron las correspondientes inmunolocalizaciones. En este experimento se empleó el anticuerpo policlonal anti-p33, que reconoce ambas proteínas (Covarrubias, 1995). Tanto en maíz como en tabaco se observó señal a lo largo de la superficie del polen y tubo polínico, lo que indica la existencia de homólogos de p33 y p36 (Fig. 10). Covarrubias et al. (1995) han propuesto que ambas proteínas podrían actuar como ligandos a la membrana plasmática. Para conocer el nivel de semejanza entre p33 y p36 y los homólogos de polen, sería necesario aislar, purificar, secuenciar y comparar ambos grupos de proteínas.

Actualmente se sabe poco sobre la identidad y funcionamiento de proteínas vegetales de unión a membrana celular. Al respecto en pistilos de

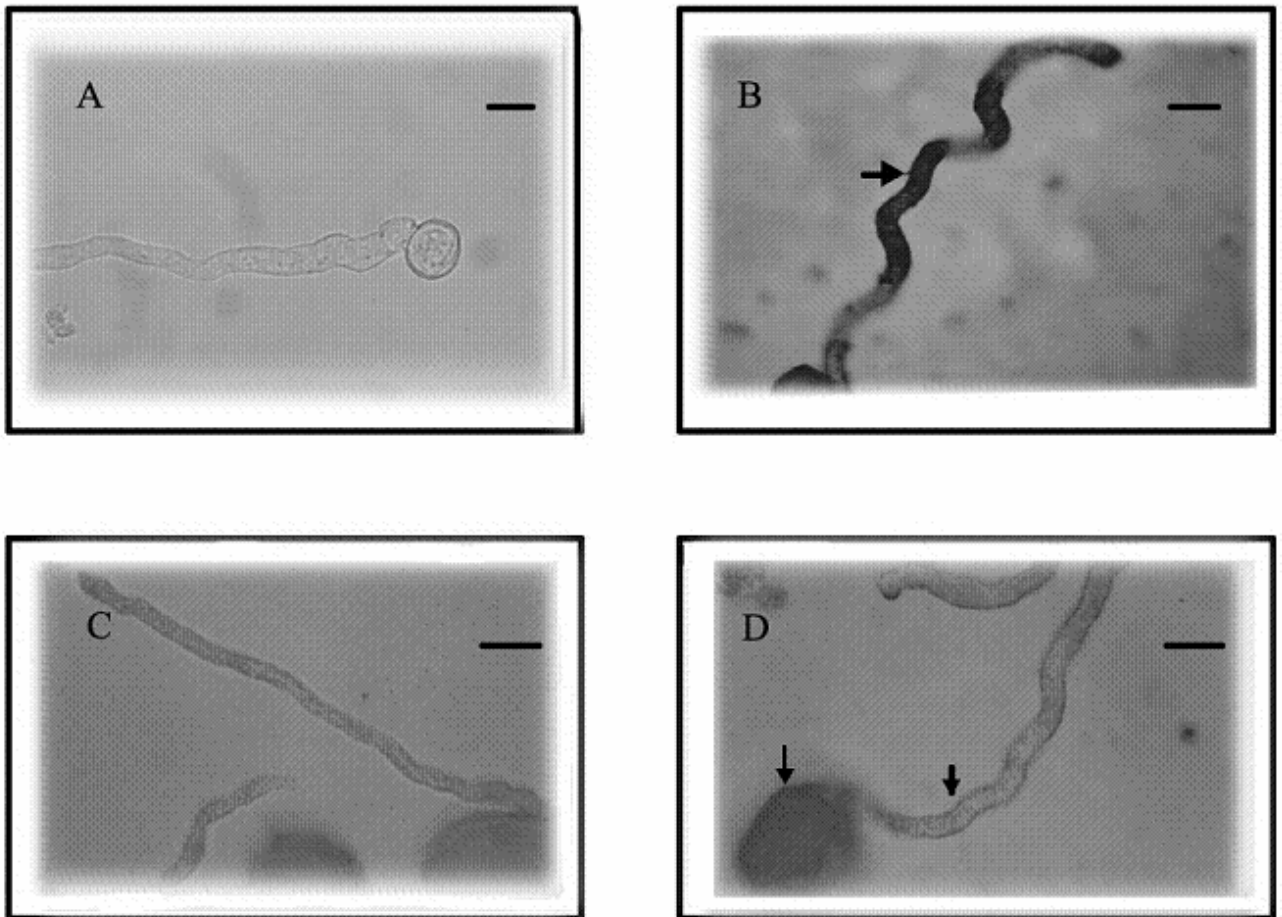


Fig. 10. Inmunolocalización de PRPs en polen germinado de tabaco (A, B) y maíz (C, D). Reacción preinmune (A,C) e inmune (B, D), después de fijadas las muestras fueron incubadas con anti p33 y p36 de frijol. Notar que la señal se presenta en polen y tubo polínico en B y D. Barra = 911 μm .

Cyanara cardunculus se determinó una proteinasa relacionada específicamente con una proteína de 100 kDa del polen (Faro et al., 1999).

Debido a la abundancia de HRGPs en tejidos sexuales, se ha planteado que éstas tienen otras funciones además de la estructural. Por ejemplo, se ha sugerido que las AGPs podrían actuar como proteínas de unión de membrana a matriz extracelular (Lord y Sanders, 1992).

IV.2.2 Localización de tapones de calosa y HRGPs en tubo polínico de maíz y tabaco

La calosa es un polisacárido que se localiza en la capa interna del tubo polínico (Mascarenhas, 1993). Trabajos experimentales han mostrado la presencia de algunas HRGPs asociadas a la pared de calosa. Ejemplos de ello son la proteína Pex1 de maíz y NTP303 de tabaco (Rubinstein et al., 1995b, Wittink et al., 2000). La Fig. 11 C muestra los tapones de calosa característicos del tubo polínico del maíz; mientras que en la Fig. 11 B se muestran acumulaciones regulares del anticuerpo de antiextensina de soya en sitios que podrían coincidir con la presencia de tapones de calosa. De hecho, existen antecedentes experimentales que apoyan estos resultados. En relación con esto la proteína PELPIII, localizada inicialmente en el tejido transmitivo de *Nicotiana*, es translocada, casi completamente, de la matriz extracelular hacia la pared de calosa del tubo polínico después de la polinización. Luego se concentra principalmente en la zona donde se encuentran los tapones de calosa de tubos polínicos maduros (de Graaf et al., 2003).

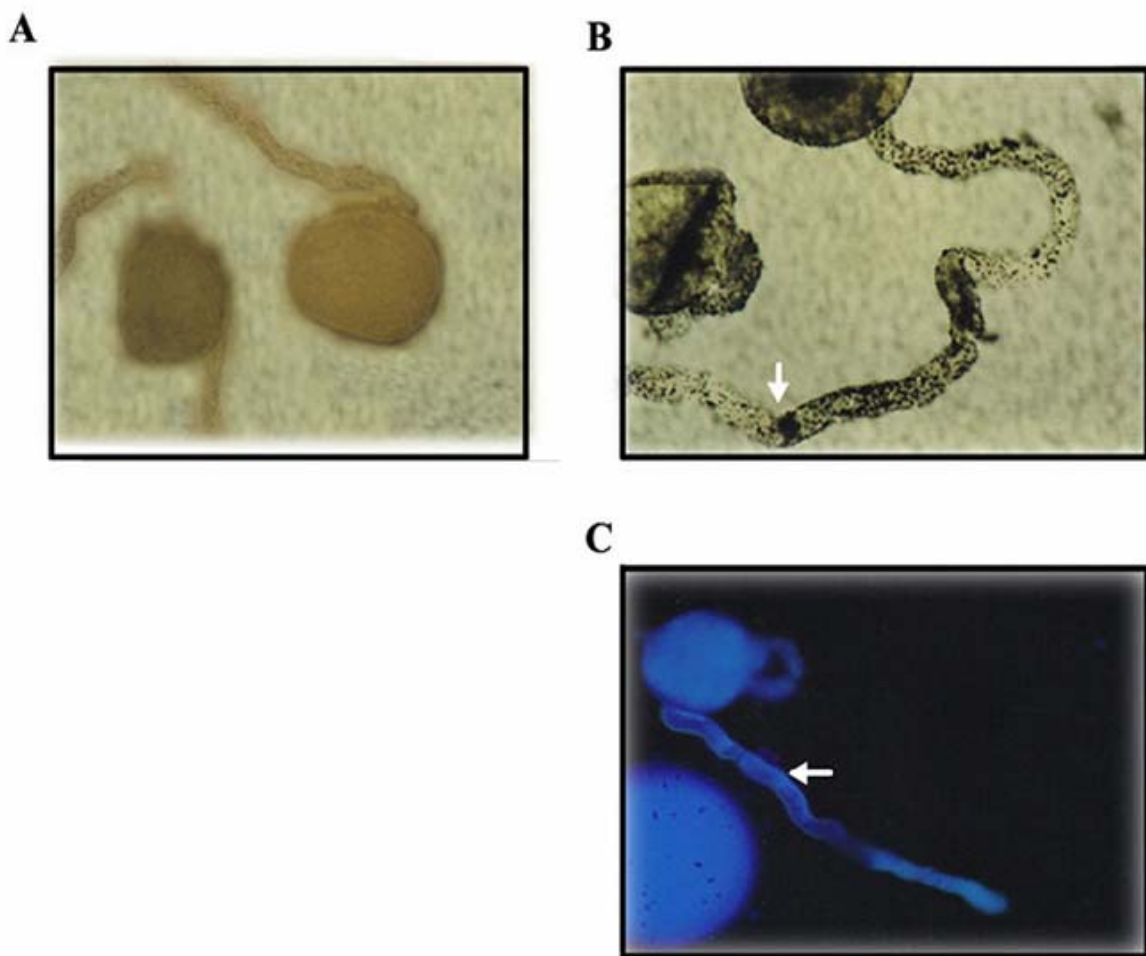


Fig. 11. Inmunolocalización de extensinas y PRPs en polen germinado de maíz. Después de germinado el polen fue fijado e incubado con suero preinmune (A) y con el anticuerpo primario antiextensina de soya (B). Imagen de fluorescencia del polen teñido con azul de anilina(C). La flecha indica que la acumulación de extensinas y PRP podría coincidir con tapones de calosa. Barra = 363 μ m.

La comprobación de la concentración de extensinas y PRPs en esta región, podría obtenerse mediante el análisis comparativo de las

inmunolocalizaciones de regiones con y sin tapones de calosa, utilizando microscopía electrónica.

IV.2.3 Efecto del anticuerpo de anti-extensina de testa de soya en la formación del tubo polínico.

Para determinar la posible participación de las extensinas y PRPs en el ensamblaje de la pared del tubo polínico, se adicionó anticuerpo antiextensina de soya al medio de germinación del polen de tabaco (diluciones 1:50 y 1:20).

No se observaron cambios aparentes en la morfología del tubo (Fig. 12).

Contrariamente, en el caso de las AGPs la adición del reactivo de Yariv al medio de germinación *in vitro* del polen de *Lilium*, alteró la morfología del ápice y estructura de la pared e interrumpió el crecimiento del tubo polínico a los 10 minutos de ser añadido.

Se ha sugerido que el reactivo de Yariv interfiere en el ensamblaje de las AGPs debido a que bloquea los sitios que deberían ser ocupados por estas proteínas, (Roy et al., 1998). La aparente carencia de efecto del anticuerpo antiextensina de soya en la morfología del tubo, podría deberse a que las proteínas del anticuerpo afines a los epitopes, son insuficientes para alterar su formación. Otra posibilidad, es que ocurran cambios sutiles en la morfología del tubo, visibles solamente con un aumento microscópico mayor.

IV.3 Experimentos con tejidos sexuales femeninos

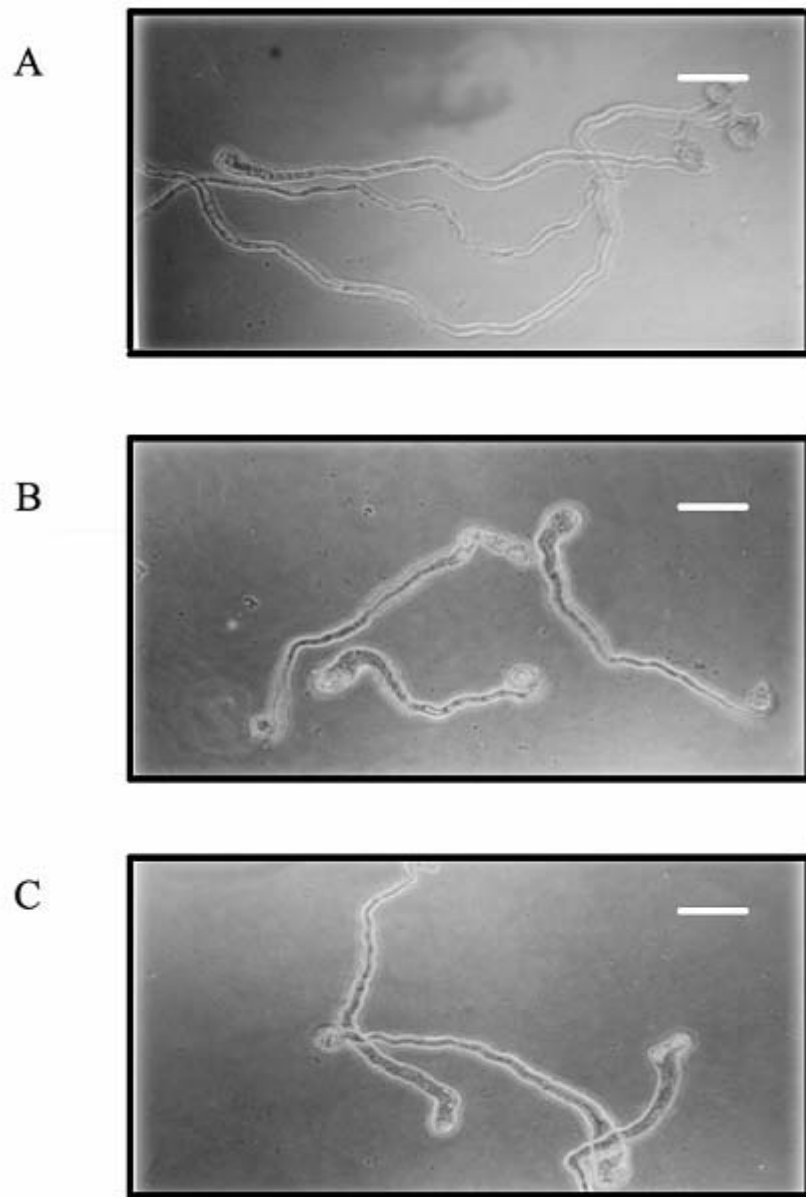


Fig. 12. Efecto de la adición del anticuerpo antiextensina de testa de soya en la germinación *in vitro* de polen de tabaco. (A) dilución 1:50. (B) dilución 1:20. Control anticuerpo antiprofilina de frijol, dilución 1:20. (C). Barra 363 μ m.

IV.3.1 Determinación colorimétrica de la relación entre la concentración de HRGPs y la longitud del pistilo de tabaco e *Impatiens* sp.

Para determinar la relación entre la longitud del pistilo y concentración de HRGPs, se cuantificó la Hyp en ese órgano, en maíz, tabaco e *Impatiens* sp., los cuales presentan notable variación en longitud (Fig. 13). Para ello, se consideró que en ausencia de lignina, órganos de mayor longitud podrían presentar niveles elevados de estas proteínas, en respaldo a la función mecánica de sostén. Los resultados muestran que en el caso de maíz, cuya longitud del pistilo es el doble que la de tabaco, se cumple la relación directa, mayor longitud; mayor concentración de Hyp; pues el maíz mostró hasta 37% más Hyp_{Tot}, 25 % más Hyp_{Ext} y 20% Hyp_{Ins}, que el pistilo de tabaco (Cuadro 8A). Sin embargo, esta proporción no se repite entre los pistilos de tabaco e *Impatiens* sp. A pesar de que la longitud de éste último fue 13 veces menor que la de tabaco, los niveles de Hyp_{Tot} fueron similares (Cuadro 8D).

Por otra parte el pistilo de tabaco contiene cuatro y 16% más Hyp_{Ext} e Hyp_{Ins}, respectivamente que el de *Impatiens*. Los resultados anteriores no permiten establecer con claridad una relación entre longitud y contenido de Hyp en pistilos de estas especies. Por ello, sería adecuado realizar otras evaluaciones de Hyp_{Tot} que incluyeran nuevos genotipos y especies de plantas que presentaran pistilos con diversas longitudes. Estos experimentos podrían complementarse, con una cinética comparativa de la acumulación de Hyp en la etapa inicial, media y final de la formación del pistilo. Además podrían incluirse

los niveles de Hyp_{Tot} , Hyp_{Sol} e Hyp_{Ins} con el propósito de relacionar las etapas de desarrollo del pistilo y los patrones de acumulación de Hyp.



Fig. 13. Fotografía que muestra la diferencia de longitud entre pistilos de (A) maíz, (B) *Impatiens* sp. y (C) tabaco.

Cuadro 8. Distribución de hidroxiprolina en la pared celular de gineceos de maíz, tabaco e *Impatiens* sp. **(A)**: HRGPs totales (Hyp_{Tot}), **(B)**: HRGPs unidas de manera no covalente (Hyp_{Ext}), **(C)**: HRGPs unidas covalentemente a la pared (Hyp_{Ins}). **(D)** longitud del pistilo (\pm : desviación o error estándar).

	<i>Impatiens</i> sp.	Maíz	Tabaco
(A) Hyp _{Tot} μgHyp/mg peso seco)	0.79 b (\pm 0.17)	1.21 a (\pm 0.22)	0.76 b (\pm 0.15)
(B) Hyp _{Ext} μgHyp/ 0.2M CaCl ₂)	0.12 c (\pm 0.09)	0.745 a (\pm 0.10)	0.553 b (\pm 0.13)
(C) Hyp _{Ins} μgHyp/mg peso seco)	1.10 c (\pm 0.083)	1.73 a (\pm 0.070)	1.38 b (\pm 0.095)
(D) Longitud del pistilo (mm)	3.1 c (\pm 0.05)	109.38 a (\pm 0.84)	40.28 b (\pm 0.21)

^a Valores promedio entre columnas con la misma letra son estadísticamente similares de acuerdo a la prueba de Tuckey (P<0.05).

V.3.2 Electroforésis y Western blot de la fracción extraíble en CaCl₂ de los pistilos de maíz, tabaco e *Impatiens* sp.

Para identificar y caracterizar algunas extensinas de pistilos de maíz tabaco e *Impatiens* sp., se realizó una electroforésis con 8 μg de proteína de la fracción extraíble con CaCl₂ de cada muestra, así como el Western blot correspondiente. Se empleó el anticuerpo policlonal antiextensina de testa soya, usado en los experimentos con polen (Cassab y Varner, 1987). Los

patrones electroforéticos mostraron proteínas con diferente peso molecular y concentración, entre las tres especies (Fig. 14).

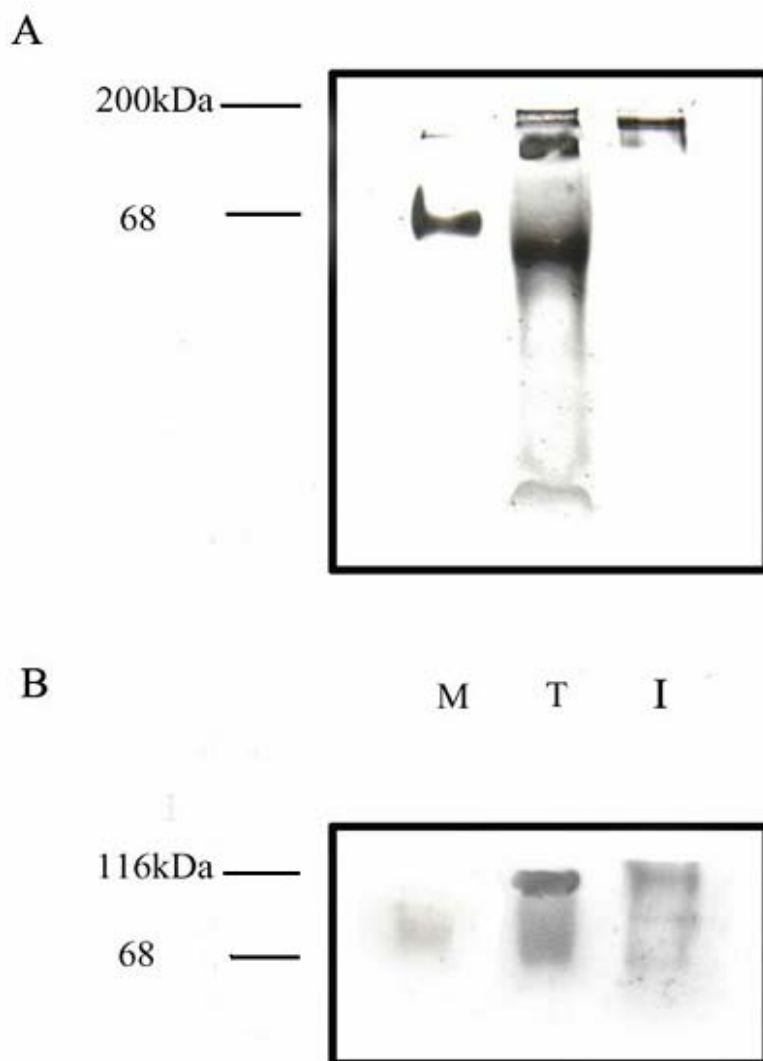


Fig. 14 Caracterización de la fracción extraíble en CaCl_2 de pistilos de maíz (M), tabaco (T) e *Impatiens* sp. (I). (A) patrón electroforético SDS-PAGE 12%. B) Western blot del que contenía un anticuerpo primario antiextensina de testa de soya.

En el caso de maíz, se observó una banda que podría corresponder a una proteína próxima a 68kD, mientras que en tabaco se presentaron dos bandas bien definidas. La primera, de aproximadamente 97 kDa y la otra con peso cercano a los 50 kDa. Por otra parte, en *Impatiens* se observó solo una banda próxima a los 200 kDa (Fig 14A). En el análisis tipo Western blot de maíz, se observa una señal muy tenue. Puesto que la evaluación bioquímica del contenido de Hyp_{Sol} de maíz fue el más alto de las tres especies, (Cuadro 8B). Los resultados indican que parece existir afinidad inmunológica limitada entre las extensinas de la testa de soya y los epitopes de las HRGPs de los pistilos (Fig. 14 B). En el caso del tabaco, la señal mostró dos proteínas, quizá de diferente peso, el tamaño de la más intensa se encuentra próximo a los 116 kDa y es semejante a la determinada por Bonilla et al. (1997a) en extractos salinos de nódulo de frijol. Además, se observa una señal tenue contigua, a la primera que comprende desde los 116 hasta los 68 kDa.

En referencia a *Impatiens*, la señal abarca desde los 200 hasta los 50 kDa, la banda más intensa también con peso de 116 kDa, de nódulos de frijol (Bonilla et al., 1997a).

Actualmente las HRGPs de tejidos sexuales femeninos mejor descritas molecular y bioquímicamente, provienen del tejido transmitivo de plantas del género *Nicotiana*.

IV.3.3 Comparación entre patrones electroforéticos y análisis tipo Western blot de polen y pistilo de maíz

Para explorar la posibilidad de que el pistilo y el tubo polínico compartan proteínas con peso molecular similar se comparó el patrón electroforético de la fracción extraíble en CaCl_2 de polen y pistilo de maíz. Éste muestra diferencia en el número y peso molecular de las proteínas de ambas estructuras (Figs. 9A y 14A). En el caso del polen, se observa un gradiente que va desde los 200 hasta los 10 kDa, resaltan dos bandas de intensidad alta localizadas entre 43 y 68 kDa. En el pistilo de maíz, únicamente se presenta una banda de aproximadamente 68 kDa, cuyo peso coincide con otras de tamaño semejante, pero de mayor intensidad en el polen. Así mismo, el análisis tipo Western blot de polen y pistilo de maíz mostró una banda tenue entre 70 y 90 kDa, ausente la fracción correspondiente al polen (Figs. 9 y 14 B). Este resultado no indica que ambas estructuras carezcan de proteínas comunes, y sí sugiere que contienen proteínas con antígenos no afines al anticuerpo antiextensina de testa de soya. Para establecer un patrón electroforético más completo para la búsqueda de proteínas comunes, sería necesario incluir otros cultivares de maíz y explorar varias etapas de desarrollo del pistilo. Además, podrían emplearse otros anticuerpos anti-HRGPs.

A pesar de la abundancia de HRGPs en tejidos sexuales femeninos, únicamente se ha descrito molecularmente un grupo reducido de ellas. Entre los genes relacionados con extensinas se encuentra *pt11*, de *Antirrhinum*, cuya proteína podría contribuir al mantenimiento de las características de soporte del pistilo, sin reducir su plasticidad (Baldwin et al., 1992). Otro grupo interesante son las CELPs (Cys-rich extensin like proteins), las cuales contienen un dominio tipo extensina y regiones con residuos de Cis, que aparentemente

participan en la polinización, fertilización y protección del ovario (Wu et al., 1993).

IV.3.4 Análisis tipo Northern blot de tejidos sexuales de maíz, tabaco y pino

Investigaciones previas han descrito que ENOD2 de frijol inmunoprecipita *in vitro* con el anticuerpo policlonal de antiextensina de soya lo que confirma la afinidad bioquímica entre ambas proteínas (Bonilla et al., 1997a). Para determinar la posible expresión de homólogos ENOD2 en tejidos sexuales de maíz, tabaco y pino, se realizó un análisis tipo Northern en inflorescencias femeninas y masculinas de maíz, en gineceo y androceo de tabaco y en conos masculinos de pino. Los argumentos que condujeron a la búsqueda de homólogos ENOD2 en inflorescencias de maíz fueron los siguientes: a) ENOD2 es una PRP que tiene secuencias comunes en extensinas (Franssen, 1989; Cassab, 1998), b) la afinidad entre la extensina aislada de la testa de soya y ENOD2 ha sido determinada previamente mediante inmunoprecipitación (Bonilla, 1997a), c) existen antecedentes de la presencia de nodulinas en flores de chícharo, tal es el caso de ENOD12, cuya secuencia corresponde a una proteína rica en Pro e Hyp (Scheres et al., 1990) d) la inmunolocalización de extensinas y PRPs con el anticuerpo antiextensina de soya en tejidos sexuales resultó positiva. Se comprobó la presencia de homólogos de transcritos ENOD2 (Fig. 15 A, C) en tejidos sexuales de maíz, tabaco y pino. En esta última especie se dificultó realizar el Northern por el método convencional, por eso se recurrió a una hibridación de punto.

Para conocer si la expresión de los homólogos ENOD2 se limitaba a tejidos sexuales, se efectuó el análisis tipo Northern de tejidos estériles de la flor de tabaco (Fig. 16A).

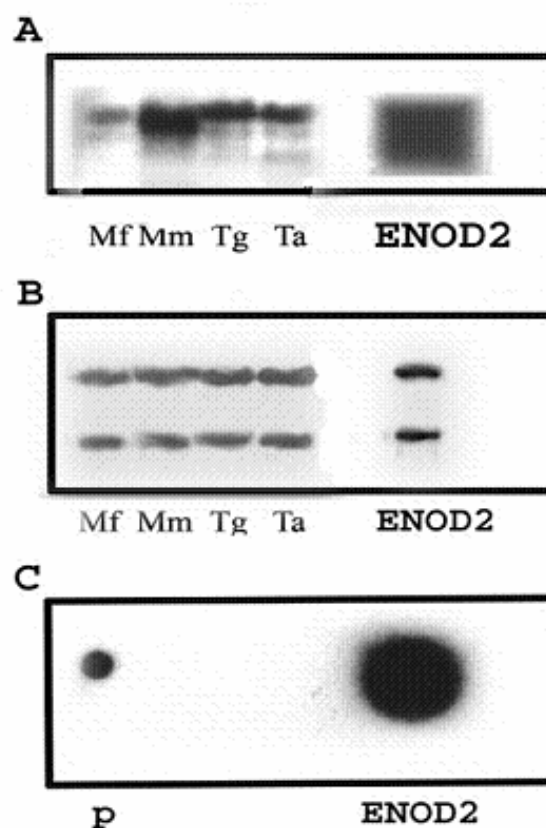


Fig. 15. Análisis tipo Northern blot (A) y electroforesis (B) correspondiente a flores femeninas (Mf) y masculinas de maíz (Mm); pistilo (Tg) y androceo de tabaco (Ta). Hibridación de conos masculinos de pino (C). Las muestras se obtuvieron de plantas en antesis y fueron hibridadas a alta astringencia con un fragmento de 1400 pb de ENOD2 de frijol.

Se seleccionó tabaco para los análisis posteriores, debido a la facilidad. Para conocer si la expresión de los homólogos ENOD2 se limitaba a tejidos sexuales, se efectuó el análisis tipo Northern de tejidos estériles de la flor de tabaco (Fig. 16A).

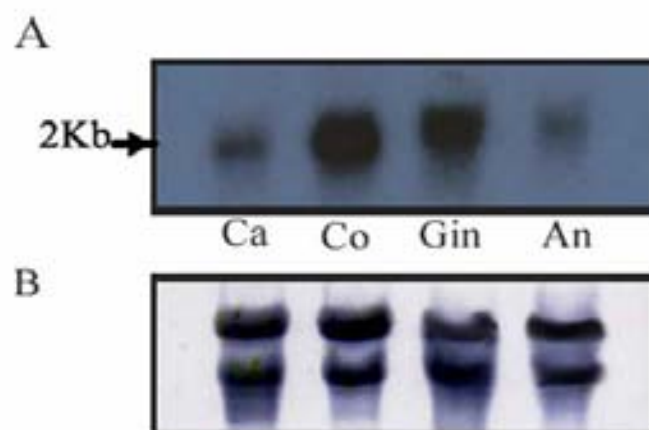


Fig. 16. Northern blot (A) y electroforesis correspondiente a y (B) cáliz (Ca), corola (Co), gineceo (Gin) y androceo (An) de flores de tabaco. Las muestras se obtuvieron de plantas en antesis, hibridadas a alta astringencia con un fragmento de 1400 pb de ENOD2 de frijol.

Puesto que los transcritos se presentaron en tejidos estériles de la flor, se procedió a determinar su posible expresión en raíz, tallo y hoja (Fig. 17A). Los resultados indican que los transcritos no son específicos de flor, pues detectaron, con poca intensidad, en tallo y hoja (Fig. 17A). Se demostró anteriormente que los mensajeros de homólogos ENOD2 se localizan tanto en tejidos fértiles como estériles. De lo expuesto en el párrafo anterior surge la siguiente cuestión ¿cómo puede existir una nodulina en plantas no leguminosas y además expresarse en varias de sus estructuras.

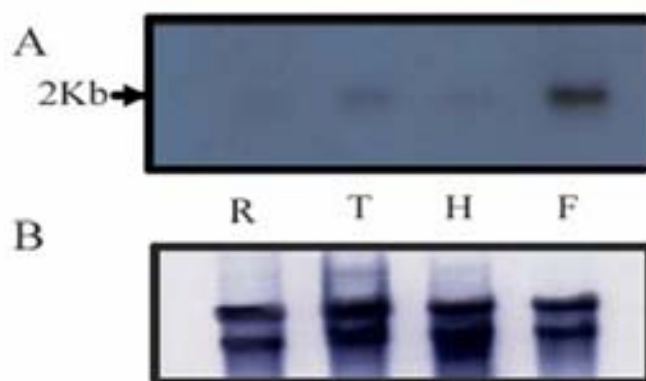


Fig. 17. Análisis tipo Northern blot (A) y electroforesis correspondiente a (B) raíz (R), tallo (T), hoja (H) y flor de tabaco (F). Las muestras se obtuvieron de plantas en antesis, hibridadas en alta astringencia, con un fragmento de 1400 pb de ENOD2 de frijol.

El término nodulina se propuso para describir a las proteínas que se expresan exclusivamente en el nódulo. ENOD2 corresponde a una PRP con secuencias comunes a extensinas (Bonilla et al., 1997 a). Proteínas semejantes a la extensina de soya se inmunolocalizaron en polen y en tejidos sexuales de maíz, tabaco y pino. Los resultados muestran que ENOD2 tiene homólogos en estas especies. Es probable que el fragmento ENOD2 de frijol utilizado como sonda, hibride con poblaciones de mensajeros semejantes, pero no idénticos al ADN original. Una experiencia parecida ocurrió con la nodulina ENOD12 que también se expresó en tallo y flor. Para determinar la existencia de distintas poblaciones de mensajeros, los autores recurrieron al mapeo con RNasa, una técnica que diferencia la longitud del extremo Poli(A) de ARNs específicos en

una muestra de ARN. El análisis mostró dos tipos de transcritos ENOD12, unos específicos de nódulo, y otros que también se expresaban en tallo y flor (PsEnod12) (Scheres et al., 1990).

Para conocer el porcentaje de homología entre los genes ENOD2 y sus homólogos, sería necesario aislar la población de transcritos de 2 Kb, obtener el ADN, secuenciarlo y compararlo con la secuencia del gen de frijol utilizado como sonda.

La expresión y localización de las extensinas y PRPs está regulada por el desarrollo, y varían en función del tipo de tejido y ambiente al que están sujetos los organismos. Varios autores coinciden en señalar que las extensinas se expresan con más intensidad en los tejidos con herida (Cassab y Varner, 1988; Schowalter, 1993; Kieliszewski y Lamport., 1994; Sommer-Knudsen, 1998; José-Estanyol y Puigdomènech, 2000). Para conocer como influye el ambiente y la edad de la flor en la expresión de los transcritos homólogos ENOD2, se extrajo ARN de flores tabaco a las que se les habían hecho pequeñas incisiones con una aguja de disección, 24 horas antes de la extracción. Además, se aisló ARN de flores de tabaco marchitas y se comparó con el de las turgentes. La expresión de los mensajeros homólogos ENOD2 mostró un notable incremento en los tejidos de heridos, mientras que la señal perdió intensidad cuando el tejido envejeció (Fig. 14A).

La propuesta derivada de los resultados mostrados en las Figuras 15, 16, 17 y 18, es que el patrón de expresión de los transcritos homólogos ENOD2 podría corresponder a extensinas y PRPs típicas. Esta idea se basa, en que la expresión de los transcritos no es específica de ninguna región de la planta, ni

tampoco de la flor. Además la señal se incrementa en condiciones de herida y se reduce con la senescencia.

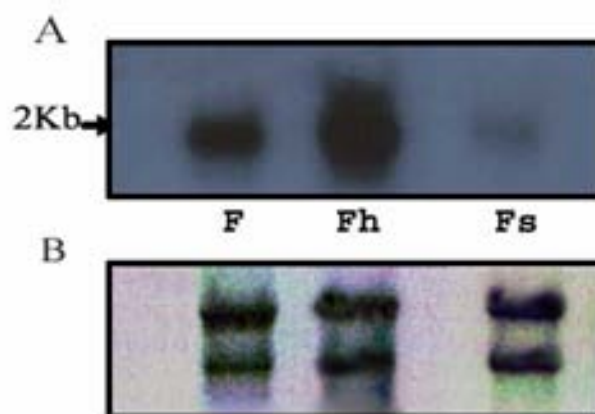


Fig. 18. Análisis tipo Northern blot (A) y electroforesis de flor (F), flor con herida (Fh) y flor senescente de tabaco (Fs). Las muestras se obtuvieron de plantas en antesis hibridadas con alta astringencia con un fragmento de 1400 pb de ENOD2 de frijol.

Se ha demostrado que el nivel de extensinas aumenta en sitios con lesiones, por ello, algunas de estas proteínas actúan como barreras estructurales. También podrían aglutinar microorganismos, y restringir el paso de agentes infecciosos al interior de la planta (Cassab y Varner, 1988).

Por otra parte, la síntesis de HRGPs está asociada a paredes de células metabólicamente activas, ello explicaría la reducción en la concentración de estas proteínas, flores senescentes (José-Estanyol y Puigdoménech, 1993).

VI) CONCLUSIONES

1.- La deficiencia de boro en maíz y tabaco se manifestó en reducción del porcentaje de germinación, y longitud del tubo polínico. Sin embargo en *Impatiens* sp. lirio y pino, los porcentajes de germinación fueron semejantes en medio deficiente y suficiente en boro, aunque la longitud del tubo polínico se incrementó con la adición de boro.

2.- Se observó tendencia al incremento en la demanda de boro, concomitante al aumento en los niveles de hidroxiprolina total en las especies de polen estudiadas.

3.- En el polen de maíz la adición de boro hasta niveles óptimos incrementó los niveles de HRGPs unidas al tubo polínico de forma covalente y no covalente.

4.- La pared del tubo polínico de *Impatiens* pino y lirio pueden contener menos HRGPs que la de maíz y tabaco.

5.- Las HRGPs de maíz extraíbles en solución salina fueron modificadas en presencia de boro.

6.- La relación entre longitud del pistilo y concentración de Hyp debe comprobarse.

7.- El pistilo y el tubo polínico de maíz tuvieron extensinas y PRPs que comparten epítopes.

8.- Existen transcritos homólogos de la nodulina ENOD2 en maíz, tabaco y pino, cuya expresión no es especie ni órgano específico, y que podría corresponder a HRGPs “típicas”.

VII) PERSPECTIVAS

1. -Realizar evaluaciones de la concentración y distribución de Hyp en polen de un mayor número de especies sin y con requerimiento de boro.

2.-Determinar la concentración de hidroxiprolina total, soluble e insoluble, en el tubo polínico de diferentes cultivares de maíz y su relación con la concentración de boro.

3.-Establecer el efecto de diferentes anticuerpos anti-extensina y proteínas ricas en prolina, en la morfología del tubo de especies de polen sin y con requerimiento de boro, mediante microscopia electrónica.

4.- Evaluar la relación entre la concentración de hidroxiprolina de pistilos de diferentes especies y su longitud.

5.- Extraer, purificar y secuenciar los homólogos p33 y p36 de tabaco o maíz para conocer su nivel de homología con los de frijol.

6.- Aislar los genes homólogos ENOD₂ de maíz, tabaco y pino y comparar la secuencia con los de otras proteínas de pared mediante un programa de alineación como el Clustal W. Con ello se determinaría la similitud e identidad de los homólogos con otros genes de pared.

VII) LITERATURA CONSULTADA

- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408:796-815
- Arioli, T., L. Peng, A. S. Betzner, J. Burn, W. Wittke, W. Herth, C. Camilleri, H. Hofte, J. Planzinski, R. Birch, A. Cork, J. Glover, J. Redmond, R. E. Williamson (1998) Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*. 279: 717-720
- Baldwin, T. C., E. S. Coen, H. G. Dickinson (1992) The *ptl1* gene expressed in the transmitting tissue of *Antirrhinum* encodes an extensin-like protein. *Plant. J.* 2: 733-739
- Bedinger, P. A., M. D. Edgerton (1990) Developmental staging of maize microspores reveals a transition in developing microspore proteins. *Plant Physiol.* 92:474-479
- Blaser-Grill, J., J. D. Knoppink, A. Amberg, H. Goldach (1989) Influence of boron on membrane in *Elodea densa* and *Helianthus annuus* and H⁺ extrusion of suspension cultured *Daucus carota* cells. *Plant Physiol.* 90:280-284
- Blevins, D. G., K. M. Lukaszewski (1998) Boron in plant structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49:481-500
- Boavida, L. C., A. M. Vieira, J. D. Becker, J. A. Feijó (2005) Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote. *Int J Dev Biol.* 49: 615-632
- Bonilla, I., C. Mergold-Villaseñor, M. E. Campos, N. Sánchez, H. Pérez, L. López, L. Castrejón, F. Sánchez, G. I. Cassab (1997a) The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyprolin-proline-rich proteins. *Plant Physiol.* 115:1329–1340
- Bonilla, I., H. Pérez, G. I. Cassab, M. Lara, F. Sánchez (1997b) The effects of boron deficiency on development in indeterminate nodules: changes in cell wall pectin contents and nodule polypeptide expression. In: *Boron in Soils and Plants*. Eds. R. W. Bell and B. Rerkasem. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 213–220
- Bosch, M., J. Sommer-Knudsen, J. Derksen, C. Mariani (2001) Class III pistil specific extensin-like proteins (PELP III) from *Nicotiana tabacum* have characteristics of arabinogalactan proteins. *Plant Physiol.* 125:2180–2188
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248:254
- Brett, C., K. Waldron (1990) Physiology and biochemistry of plant cell walls. *Topics in Plant Physiology*. M. Black and J. Chapman (Eds) Unwin Hyman, London. 193 p
- Brisson, L. F., R. Tehaken, C. Lamb (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell.* 6:1703-1712

- Buchanan, B. M., W. Gruissem, R. L. Jones. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. B.B. (Eds.), American Society of Plant Physiologists. USA. 1367p
- Cai, G., A. Moscatelli, M. Cresti (1997) Cytoskeletal organization and pollen tube growth. *Trends Plant Sci.* 2: 86-91
- Cakmak, I., V. Römheld (1997) Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil.* 193: pp. 71-83
- Carpita, N. C., D. M. Gibeaut (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30
- Carpita, N. C., M. McCann, L. R. Griffing (1996) The plant extracellular matrix: News from the cell's frontier. *Plant Cell.* 8:1451-1463
- Cassab, G. I. (1998) Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49:281-309
- Cassab, G. I., J. E. Varner (1987) Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and tissue printing on nitrocellulose paper. *J Cell Biol.* 105:2581-88
- Cassab, G. I., J. E. Varner (1988) Cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 39:321-53
- Cassab, G. I., J. Nieto-Sotelo, J. B. Cooper, G. J. Van Holst, J. E. Varner (1985) A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. *Plant Physiol.* 77:532-535
- Cassab, G. I. (1993) Localization of cell wall proteins using tissue-print western blot techniques. *Methods Enzymol.* 218:682-688
- Chapple, C., N. Carpita (1998) Plant cell walls as targets for biotechnology. *Curr Opin Plant Biol.* 1:179-185
- Chen, C.G., E. C. Cornish, A. E. Clarke (1992) Specific expression of an extensin-like gene in the style of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell.* 4:1053-062
- Cheng, C., B. Rerkasem (1993) Effects of boron on pollen viability in wheat. *Plant and Soil.* 155/156: 313-315
- Cheung, A. Y., H. Wang, H-M. Wu (1995) A floral transmitting tissue specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell.* 82:383-393
- Coimbra, S., R. Salema (1997) Immunolocalization of arabinogalactan proteins in *Amaranthus hypochondriacus* L. ovules. *Protoplasma.* 1999:75-82
- Cosgrove, D. J. (1997) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:171-201

- Cosgrove, D. J. (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol Biochem.* 38:109-124
- Cosgrove, D. J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 11: 850-861
- Cosgrove, D. J., P. Bedinger, D. M. Durachko (1997) Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *PNAS.* 94:6559-6564
- Covarrubias, A., J. W. Ayala, J. L. Reyes, M. Hernández, A. Garciarrubio (1995) Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 107:1119-1128
- de Graaf, B. H. J., B. A. Knuiman, J. Derksen, C. Mariani (2003). Characterization and localization of the transmitting tissue-specific PELP III proteins of *Nicotiana tabacum*. *J Exp Bot.* 54:55-63
- de Oliveira, D. E., L. O. Franco, C. Simoens, J. Seurinck, J. Coppieters, J. Botterman, M. van Montagu (1993). Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycine-rich proteins. *Plant J.* 3:495-507
- de Win, A. H. N., B. Knuiman, E. S. Pierson, H. Geurts, H. M. P. Kengen, J. Derksen (1996) Development and cellular organization of *Pinus sylvestris* pollen tubes. *Sex Plant Reprod.* 9:93–101
- Dell, B., L. Huang (1997) Physiological response of plants to low boron. *Plant Soil* 193:103-120
- Delmer, D. P., Y. Amor (1995) Cellulose biosynthesis. *Plant Cell.* 7:987-1000
- Dembitsky, V. M., R. Smoum, A. A. Al-Quntar, H. A. Ali, I. Pergament, M. Srebnik (2002) Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Sci.* 163:931-942
- Drozd, M., E. Kucharaz, J. Szja (1976) A colorimetric micromethod for determination of hydroxyproline in blood serum. *Z. Med. Labortech.* 17:163-171
- Du, H., R. J. Simpson, A. E. Clarke, A. Bacic (1996) Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana glauca*. *Plant J.* 9:313-323
- Du, H., R. J. Simpson, R. L. Moritz, A. E. Clarke, A. Bacic (1994) Isolation of the protein backbone of an arabinogalactan-protein from the styles of *Nicotiana glauca* and characterization of a corresponding cDNA. *Plant Cell.* 6:1643-1653
- Edlund, A. F., R. Swanson, D. Preuss (2004) Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell.* 16:S84-S97

- Elleman, C. J., V. Franklin-Tong, H. G. Dickinson (1992) Pollination in species with dry stigmas: the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes. *New Phytol.* 21: 413-24
- Erbar, C. (2003) Pollen tube transmitting tissue: place of competition of male gametophytes. *Int J. Plant Sci.* 164: S265-S277
- Ertl, H., A. Hallmann, S. Wenzl, M. Sumper (1992) A novel extensin that may organize extracellular matrix biogenesis in *Volvox carteri*. *EMBO J.* 11:2055–2062
- Evrard, J. L., C. Jako, A. Saint-Guily, J. H. Weil, M. Kuntz (1991) Anther specific, developmentally regulated expression of genes encoding a new class of proline-rich proteins in sunflower. *Plant Mol Biol.* 16:271-281
- Faro, C., M. Ramalho-Santos, M. Vieira, A. Mendes, J. Simoes, R. Andrade, P. Verissimo, X. L. Lin, J. Tang, E. Pires (1999) Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A and RGD-containing plant aspartic proteinase. *J Biol Chem.* 274:28724-28729
- Farrokhi, N., R.A Burton, L. Brownfield, M. Hrmova, S. M. Wilson, A. Bacic, G. B. Fincher (2006) Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification. of key genes. *Plant Biotechnol J.* 4:145-67
- Feijó, J. A., S. S. Costa, A. M. Prado, J. D. Becker, A. C. Certal (2004) Signalling by tips. *Curr Opin Plant Biol.* 7:589–598
- Feijó, J. A. J. Sainhas, G. R. Hackett, J. G. Kunkel, P. K. Hepler (1999). Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J. Cell Biol.* 144:483-496
- Ferguson, C., T. T. Teeri, M. Siika-aho, S. M. Read, A. Bacic (1998) Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 206:452-460
- Fleisher, A., M. A. O'Neill, R. Ehwald (1999) The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Plant Physiol.* 121:829-38
- Fowler, T. J., C. Bernhardt, M. L. Tierney (1999) Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins. *Plant Physiol.* 121:1081–1091
- Frankling-Tong, V. E. (1999) Signaling and the modulation of pollen tube growth. *Plant Cell.* 11:727-38
- Franssen, H. J., D. V. Thompson, K. Idler, R. Kormelink, A. B. van Kammen, T. Bisseling (1989) Nucleotide sequence of two soybean ENOD2 early nodulin genes encoding Ngm-75. *Plant Mol Biol.* 14:103-106
- Fry, S. C. (1986) Cross-linking matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol.* 37:165-186
- Fry, S. C. (1988) The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman Scientific & Technical. U. K. 333 p.

- Fry, S. C. (1995) Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 46:497-520
- Fry, S. C. (2004) Tansley Review: Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol.* 161:641–675
- Gao, M., M. J. Kieliszewski, D. T. A. Lampert, A. M. Showalter (1999) Isolation, characterization and immunolocalization of a novel, modular tomato arabinogalactan-protein corresponding to the *LeAGP-1* gene. *Plant J.* 18:43–55
- García-Gómez, B., F. Campos, M. Hernández, A. Covarrubias (2000) Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. *Plant J.* 22:277-88
- García-Hernández, E., G. I. Cassab L. (2005) Structural cell wall proteins from five pollen species and their relationship with boron. *Braz J Plant Physiol.* 17: 375-381
- Geitmann, A., R. Palanivelu (2007) Fertilization requires communication: Signal generation and perception during pollen guidance. *Floriculture and Ornamental Biotechnology.* 1:77-89
- Geitmann, A., M. Steer (2006) The architecture and properties of the pollen tube cell wall. In: Malhó R (Ed) *The Pollen Tube: A Cellular and Molecular Perspective.* Plant Cell Monographs. Springer Verlag, Berlin. pp 177-200
- Geitmann, A., E. Parre. (2004) The local cytomechanical properties of growing pollen tubes correspond to the axial distribution of structural cellular. *Sex Plant Reprod.* 17:9-16
- Gens, S. J., M. Fujiki, B. G. Pickard (1999) Arabinogalactan protein and wall-associated kinase in a plasmalemmal reticulum with specialized vertices. *Planta.* 212: 115-134
- Goldman, M. H., M. Pezzotti, J. Seurinck, C. Mariani. (1992). Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. *Plant Cell.* 4:1041–1051
- Goldraij, A., K. Kondo, C. B. Lee, C. N. Hancock, M. Sivaguru, S. Vasquez-Santana, S. Kim, T. E. Phillips, F. Cruz-Garcia, B. McClure (2006) Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature.* 439:805-810
- Grant, R. J. S. (1997) Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: Dey PM, JB Harborne (Eds) *Plant Biochemistry* Academic Press. London UK pp. 205-236
- Hancock, C. N., L. Kent, B. A. McClure (2005) The 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* 43:716–723
- Hay, J. C., P. L. Fiset, G. H. Jenkins, K. Fukami, T. Takanawa, R. A. Anderson, T. F. J. Martin (1995) ATP-dependent inositolide phosphorylation required for Ca²⁺-activated secretion. *Nature.* 374:173-177

- Hayashi, T. (1989) Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 40:139–168
- Hepler, P. K., L. Vidali, A. Y. Cheung (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:159–87
- Herrero, M., J. I. Hormaza (1996) Pistil strategies for controlling pollen tube growth. *Sex Plant Reprod.* 9:343-347
- Heslop-Harrison, J. (1971) The pollen wall: structure and development. In: Heslop-Harrison J. (ed). *Pollen: Development and Physiology*. London: Butterworth. pp. 75-98.
- Heslop-Harrison, Y., J. Heslop-Harrison (1990) Dynamic aspects of apical zonation in the angiosperm pollen tube. *Sex Plant Reprod.* 3:187-94
- Heslop-Harrison, Y., J. Heslop-Harrison (1992) Germination of monocolpate angiosperm pollen: evolution of the actin cytoskeleton and wall during hydration, activation and tube emergence. *Ann Bot.* 69:385–394
- Holdaway-Clarke, Nicole, M. Weddle, S. Kim, A. Robi, C. Parris, J. G. Kunkel, P. K. Hepler (2003) Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. *J. Exp Bot.* 54:65-72
- Hood, E. E., J. M. Murphy, R. C. Pendleton (1993) Molecular characterization of maize extension expression. *Plant Mol Biol.* 685-695
- Hood, K. R., R. A. Baasiri, S. E. Fritz, E. E. Hood. (1991) Biochemical and tissue print analyses of hydroxyproline-rich glycoproteins in cell wall of sporophytic maize. *Plant Physiol.* 96:1214-1219
- Hu, H., S. G. Penn, C. B. Lebrilla, P. H. Brown (1997) Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants (The mechanism of phloem mobility of boron). *Plant Physiol.* 113:649-55
- Humphrey, T. V., D. T. Bonetta, D. R. Goring (2007) Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. *New Phytol.* 176:7-21
- Iiyama, K., TB-T Lam, B.A. Stone (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol* 104:315-320
- Ikeda, S., J. B. Nasrallah, R. Dixit, S. Preiss, M. E. Nasrallah (1997) An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science.* 276: 1564 -1566
- Ishii, T., T. Matsunaga, N. Hayashi (2001) Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. *Plant Physiol.* 126:698-1705
- Jackson, J. F. (1989) Borate control of protein secretion from *Petunia* pollen exhibits critical temperature discontinuities. *Sex Plant Reprod.* 2:11-14
- Jackson, P. A. P., C. I. R. Galinha, C. S. Pereira, A. Fortunato, N. C. Soares, S. B. Q. Amancio, C. P. P. Ricardo (2001) Rapid deposition of extensin during the

- elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiol.* 127:1065-1076
- Jauh, G. Y., E. M. Lord (1996) Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta.* 199:251-261
- Jeon, J. S., Y. Y. Cheung, S. Lee, G. H. Yi, B. G. Oh, G. A. (1999) Isolation and characterization of an anther-specific gene, RA8, from rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Mol Biol.* 39:35-44
- José-Estanyol, M., P. Puigdoménech (2000) Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiol Bioch.* 38: 97-108.
- José-Estanyol, M., P. Puigdoménech (1993). Structure and expression of genes coding for structural proteins of the plant cell wall. *New Phytol.* 125:259-282.
- Keller, B. (1993) Structural cell wall proteins. *Plant Physiol.* 101:1127-30
- Kieliszewski, M. J., D. T. Lamport (1994) Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J.* 5:157-72
- Kieliszewski, M. J., E. Shpak (2001) Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins. *Cell Mol Life Sci.* 58:1386–1398
- Kimura, S, W. Laosinchai, T. Itoh, X. Cui, C. R. Linder, M. Brown (1999) Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant Cell.* 11:2075-2085
- Knox, J. P. (1995) The extracellular matrix in higher plants. Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. *FASEB J.* 9: 1004-1012
- Kobayashi, M., H. Nakagawa, T. Asaka, T. Match (1999) Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca²⁺ retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiol.* 119: 199-203
- Kobayashi, M., T. Match, J. C. Azuma (1996) Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* 110:1017-20
- Kost, B., E. Lemichez, P. Spielhoffer, Y. Hong, K. Tolias, C. Carpenter, N. H. Chua (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate pollen tube growth. *J Cell Biol.* 145:317-330
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685
- Lamport, D. T. A. (2001) Life behind cell walls: paradigm lost, paradigm regained. *Cell Mol Life Sci.* 58:1363–1385
- Levy, S., L. A. Staehelin (1992) Synthesis, assembly and function of plant cell wall macromolecules. *Curr Opin Plant Biol.* 4:856-862

- Li, Y. Q., A. F. Croes, H. F. Linskens (1983) Cell-wall proteins in pollen and roots of *Lilium longiflorum*: extraction and partial characterization. *Planta*. 58:422-427
- Li, Y. Q., F. Chen, H. F. Linskens. M. Cresti (1996) Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex Plant Reprod.* 7:145–152
- Li, Y. Q., C. Faleri, A. Geitmann, H. Q. Zhang, M. Cresti (1995) Immunogold localization of arabinogalactan proteins unesterified and esterified pectins in pollen grains and pollen tubes of *Nicotiana tabacum* L. *Protoplasma*. 189:26-36
- Li, Y. Q., H. Q. Zhang, E. S. Pierson, F. Y. Huang, H. F. Linskens, P. K. Hepler, M. Cresti (1996) Enforced growth-rate fluctuation causes pectin ring formation in the cell wall of *Lilium longiflorum* pollen tubes. *Planta* 200:41-49
- Lin, Y., Z. Yang (1997) Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rop 1Ps antibodies suggests a crucial role for Rho-type GTPases in the control of tip growth. *Plant Cell*. 9:1647-1659
- Lind, J. L., A. Bacic, A. E. Clarke, M. A. Anderson (1994) A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant J.* 6:491–502
- Loomis, W. D., R. W. Durst (1992) The chemistry and biology of boron. *Biofactors*. 3: 229-239
- Lukaszewski, K. M., Blevins D. G. (1996) Root growth inhibition in boron-deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiol.* 112:1135-1140
- Majewska-Sawka, A., E. A. Nothnagel (2000) The multiple roles of arabinogalactan-proteins in plant development. *Plant Physiol.* 122:3-9
- Malhó, R. (1998) Pollen tube guidance: The long and winding road. *Sex Plant Reprod.* 11:242-244
- Malhó, R., N. D. Read., A. J. Trewavas., M. S. Pais (1995) Calcium channel activity during pollen tube growth and reorientation. *Plant Cell*. 7:1173-1184
- Mascarenhas, J. P. (1993) Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell*. 5: 1303-1314
- Match, T. (1997) Boron in plant cell walls. *Plant and Soil*. 193: pp 59-70
- Match, T., K. Ishigaki, K. Ohno, J. Azuma (1993) Isolation and characterization of a boron-polysaccharide complex from radish roots. *Plant Cell Physiol.* 34:639-42
- Match, T., K. Takasaki, M. Kobayashi (1998) Immunocytochemistry of rhamnogalacturonan II in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol.* 39:483-91
- Match, T., S. Kawaguchi, M. Kobayashi (1996) Ubiquity of a borate rhamnogalacturonan II complex in cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol.* 37:636-640

- McQueen-Mason, S., D. J. Cosgrove (1995) Expansin mode of action on cell walls. (Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding). *Plant Physiol.* 107:87–100
- Nakamura, N., H. Suzuki (1983) Cellulose and callose of the pollen tube wall of *Camellia japonica*. *Phytochemistry.* 22:2517-2519
- Nishikawa, S., G. M. Zinkl, R. J. Swanson, D. Maruyama, D. Preuss (2005) Callose (β -1,3 glucan) is essential for Arabidopsis pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol.* 5:22
- O'Neill, M. A., D. Warrenfeltz, K. Kates, P. Pellerin, T. Doco, A. G. Darvill, P. Albersheim (1996) Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *In vitro* conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *J Biol Chem.* 271:22923-22930
- Oertli, J. J. (1993) The mobility of boron in plants. In: plant nutrition from genetic engineering to field practice. Ed. N. J. Barrow pp. 393-396
- Palanivelu, R., D. Preuss (2000) Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. *Trends Cell Biol.* 10:517-524
- Park, S. Y., G. Y. Jauh, J. C. Mollet, K. J. Eckard, E. A. Nothnagel, L. L. Walling, E. M. Lord (2000). A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *Plant Cell.* 12:151–163
- Pennell, R. (1998) Cell walls: structures and signals. *Curr Opin Plant Biol* 1:504-510
- Pennell, R. I., J. P. Knox, G. N. Scofield, R. R. Selvendran, K. Roberts (1989) A family of abundant plasma membrane associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins in unique to flowering plants. *J. Cell Biol.* 108:1967–1977
- Pennell, R. I., K. Roberts (1990) Sexual development in the pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. *Nature* 344:547–549
- Pennell, R. I., L. Janniche, P. Kjellbom, G. N. Scofield, J. M. Peart, K. Roberts, (1991) Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *Plant Cell.* 3:1317–1326
- Qi, X., B. X. Behrens, P. R. West, A. J. Mort (1995) Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures. Evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin. *Plant Physiol.* 108:1691-1701
- Rae, A. L., P. J. Harris, A. Baic, A. E. Clarke (1985) Composition of the cell walls of *Nicotiana glauca* (Link et Otto) pollen tubes. *Planta.* 166:128–133
- Reiter, W. D. (1998) The molecular analysis of cell wall components. *Trends Plant Sci.* 3:27-32
- Richmond, T. A., C. R. Somerville (2000) The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol.* 124: 495-498.

- Ridley, B.L., M.A. O'Neill, D. Mohnen (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57:929–967
- Robbertse, P. J., L. A. Coetzer, J. J. Bezuidenhout, L. Vorster, N.G.N. Swart (1990b) The influence of boron on fruit set in avocado. *Acta Hort* 275:587-94
- Robbertse, P. J., J. J. Lock, E. Stoffberg, L. A. Coetzer (1990a) Effect of boron on directionality of pollen tube growth in *Petunia* and *Agapanthus*. *S. Afr. J. Bot.* 56:487-492
- Roberts, M. R., G. D. Foster, R. P. Blundell, S. W. Robinson, A. Kumar, J. Draper, R. Scott (1993) Gametophytic and sporophytic expression of an anther-specific *Arabidopsis thaliana* gene. *Plant Journal*. 3:111-120
- Roy, S. J., G. Y. Jauh, P. K. Hepler, E. M. Lord (1998) Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube. *Planta*. 204: 450-458
- Rubinstein, A. L., J. Márquez, M. Suárez-Cervera, P. A. Bedinger (1995b) Extensin-like glycoproteins in the maize pollen tube wall. *Plant Cell*. 7:2211-2225
- Rubinstein, A. L., R. T. N. Prata, P. A. Bedinger (1995a) Developmental accumulation of hydroxyproline and hydroxyproline-containing proteins in *Zea mays* pollen. *Sex Plant Reprod*. 8:27-32
- Sachetto-Martins, G., L. O. Franco, D. E. De Oliveira (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim Biofys Acta*. 1492:1-14
- Sánchez, A. M., M. Bosch, M. Bots, J. Nieuwland, R. Feron, C. Mariani (2004) Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell*. 16:S98 - S106
- Saxena, I. M., R. M. Jr Brown (1995) Identification of cellulose synthase(s) in higher plants: Sequence analysis of processive β -glycosyltransferases with the common motif "D, D, D35Q(R,Q)XRW". *J Bacterial*. 177:5276-5283
- Scheres, B., F. van Engelen, E. van der Knaap, C. van de Wiel, A. van Kammen, T. Bisseling (1990) Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell*. 2:687-700
- Schols, H.A., E. J. Bakx, D. Schipper, A. G. J. Voragen (1995) A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydr Res* 279:265–279
- Schopfer, P (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth. *Plant J*. 28:679–688
- Schultz, C. J., K. Hauser, J. L. Lind, A. H. Atkinson, Z. Y. Pu, M. A. Anderson, A. E. Clarke (1997) Molecular characterisation of a cDNA sequence encoding the backbone of a style-specific 120 kDa glycoprotein which has features of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant Biol Mol*. 35:833-45

- Schultz, C. J., L. K. Johnson, G. Currie, A. Bacic (2000) The classical arabinogalactan protein gene family of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 12:1751–1767
- Schultz, C., P. Gilson, D. Oxley, J. Youl, A. Bacic (1998) GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends Plant Sci*. 3:426-431
- Shivanna, K. R. (2003) *Pollen biology and biotechnology*. Science Publishers, Inc. India. 301p.
- Showalter, A. M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*. 5:9-23
- Showalter, A. M. (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci*. 58: 1399–1417
- Sommer-Knudsen, J., A. Bacic, A. E. Clarke (1998) Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry*. 47: 483-497
- Sommer-Knudsen J., A. E. Clarke, A. Bacic (1996) A galactose-rich, cell wall glycoprotein from styles of *Nicotiana glauca*. *Plant J*. 9:71-83
- Springall, D. R., G. W. Hacker, L. Grimelius, J. M. Polak (1984) The potential of the immunogold-silver staining method for paraffin sections. *Histochemistry*. 81:603-608
- Stafstrom, J. P, L. A. Staehelin (1986) The role of carbohydrate in maintaining extensin in an extended conformation. *Plant Physiol*. 81:242-246
- Stratford, S., W. Barnes, D. L. Hohorst, J. G. Sagert, R. Cotter, A. Golubiewski, A. M. Showalter, S. McCormick, P. Bedinger (2001) A leucine-rich repeat region is conserved in pollen extension-like (Pex) proteins in monocots and dicots. *Plant Mol Biol*. 46: 43-56
- Taylor, L. P., P. K. Hepler (1997) Pollen germination and tube growth. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48:461-91
- Taylor, N. G., R. M. Howells, A. K. Huttly, K. Vickers, S. R. Turner (2003) Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis. *PNAS*. 100: 1450–1455
- Teasdale, R. D., D. K. Richards (1990). Boron deficiency in cultured pine cells. Quantitative studies of the interaction with Ca and Mg. *Plant Physiol*. 93:1070-1077
- Thomas, J. M., M. E. Hodes (1981) A new discontinuous buffer system for the electrophoresis of cationic proteins at near-neutral pH. *Annal. Biochem*. 118:194-196
- Tierney, M. L., J. E. Varner (1987) The extensins. *Plant Physiol*. 84:1-2
- Trewavas, A.J., R. Malhó (1998) Ca²⁺ Signalling in plant cells: the big network. *Curr Opin Plant Biol*. 1:428-433

- Tyerman, S. D., C. M. Niemietz, H. Bramley (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.* 25:173-194
- van Eldik, G. J., H. W. Vriezen, M. Wiggins, R. K. Ruiter, M. M. A. van Herpen, J. A. M. Schrauwen, G. J. Wullems. (1995) A pistil-specific gene of *Solanum tuberosum* is predominantly expressed in the stylar cortex. *Sex Plant Reprod.* 8: 173–179
- Varner, J. E., L. S. Lin (1989) Plant cell wall architecture. *Cell.* 56:231-239
- Wheeler, M. J., V. E. Franklin-Tong, F. C. H. Franklin (2001). The molecular and genetic basis of pollen–pistil interactions. *New Phytologist.* 151:565–584
- Wimmer, M. A., H. E. Goldbach (1999). Influence of Ca^{2+} and pH on the stability of different boron fractions in intact roots of *Vicia faba* L. *Plant Biol.* 1:632–637
- Wright, S. Y., M. M. Suner, P. J. Bell, M. Vaudin, A. J. Greenland (1993) Isolation and characterization of male flower cDNAs from maize. *Plant Journal.* 3:41-49
- Wu, H. M., H. Wang, A. Y. Cheung (1995) A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell.* 82:395-403
- Wu, H. M., E. Wong, J. Ogdahl, A. Y. Cheung (2000) A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to tobacco TTS protein. *Plant J.* 22: 165-176
- Wu, H., B. de Graaf, C. Mariani, A. Y. Cheung. (2001) Hydroxyproline-rich glycoproteins in plant reproductive tissues: structure, functions and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 58:1418–1429
- Wu, H., J. T. Zou, B. May, Q. Gu, A. Y. Chung. (1993) A tobacco gene family for flower cell wall proteins with a proline-rich and cysteine-rich domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:6829-6833
- Yang, Z. (1998) Signal tip growth in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 1:525-530
- York, W. S., H. van Halbeek, A. G. Darvill, P. Albersheim (1990) Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ^1H -n.m.r. spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. *Carbohydr Res.* 200:9-31
- Zinkl, G. M., B. I. Zwiebel, D. G. Grier, D. Preuss (1999) Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: A species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development.* 126:5431-40
- Zonia, L., S. Cordeiro, J. Tupy, J. A. Feijó (2002) Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apical tip has a role in growth and osmoregulation and is linked to inositol polyphosphate signaling pathways. *Plant Cell.* 14:2233-2249

Structural cell wall proteins from five pollen species and their relationship with boron

Edith del R. García-Hernández^{1,*} and Gladys I. Cassab López²

¹Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 36.5 Carretera Mexico-Texcoco, Chapingo, Texcoco, México, 56230; ²Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

*Corresponding autor: edithrg@correo.chapingo.mx

Received: 05/10/2005, Accepted 20/01/2006

Boron (B) is an essential micronutrient for the survival of vascular plants. The most severe effect derived from a deficiency of B is the alteration of cell wall biogenesis and pollen germination. We investigated pollen of plant species that require B for germination (*Zea mays* L. and *Nicotiana tabacum* L.), as well as those that can germinate without B (*Pinus* sp, *Lilium longiflorum*, *Impatiens* sp.). In both groups, B addition in the growth medium increased the length of the pollen tube after germination. Hydroxyproline Rich Glycoproteins (HRGPs) are the most abundant cell wall structural proteins of dicotyledonous plants and the sexual tissues of monocotyledonous plants. Here, we show that maize pollen accumulated a significant pool of hydroxyproline (Hyp) and 63% of this amino acid was localized in the pollen tube wall. Maize pollen germinated in the presence of B accumulated soluble (48%) and non-soluble (16%) Hyp in the pollen tube wall in contrast to maize pollen germinated without B. In addition, B seems to modify the amount of HRGPs that become cross-linked to the wall. Immunolocalization of HRGPs showed that these glycoproteins were preferentially localized in the pollen tube of maize, not in the pollen grain itself. Hence, B might affect the assembling of HRGPs in the wall of pollen tubes grown *in vitro*.

Key words: cell wall, HRGPs, hydroxyproline, pollen tube.

Proteínas estruturais da parede celular do pólen de cinco espécies e sua relação com o boro: Boro (B) é um micronutriente essencial para a sobrevivência das plantas vasculares. O efeito mais drástico derivado da sua deficiência é a alteração na biogênese da parede celular durante a germinação de pólen. Investigamos pólen de espécies de plantas que requerem B para germinar (*Zea mays* L. e *Nicotiana tabacum* L.), e de outras que podem germinar na sua ausência (*Pinus* sp, *Lilium longiflorum*, *Impatiens* sp.). Em ambos os grupos, a adição de B no meio de germinação aumentou o comprimento do tubo polínico depois da germinação. Glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) são as mais abundantes proteínas estruturais da parede celular de dicotiledôneas e do tecido sexual de monocotiledôneas. Aqui, mostrou-se que pólen de milho acumulou uma significativa quantidade de hidroxiprolina (Hyp), estando 63% desse aminoácidos localizados na parede do tubo polínico. Pólen de milho germinado na presença de B acumulou Hyp solúvel (48%) e não solúvel (16%) na parede do tubo polínico, em contraste ao pólen germinado na ausência de B. Adicionalmente, B parece modificar a quantidade de HRGPs que se ligam à parede celular. Imunolocalização de HRGPs mostrou que essas glicoproteínas estavam preferencialmente localizadas na parede do tubo polínico de pólen de milho, mas não no pólen. B, portanto, pode afetar no arranjo de HRGPs na parede de tubos polínicos crescidos *in vitro*.

Palavras-chave: hidroxiprolina, HRGPs, parede celular, tubo polínico.

INTRODUCTION

Plant cell walls are a structural metabolically dynamic complex that contains a vast amount of polysaccharides and proteins with unusual physical and chemical properties.

Hydroxyproline Rich Glycoproteins (HRGPs) are the most abundant cell wall structural proteins in dicotyledonous plants and sexual tissues of monocotyledonous plants (Sommer-Knudsen et al., 1997; Cassab and Varner, 1998).

They contain highly repetitive sequence domains in which hydroxyproline (Hyp) is a major amino acid (Showalter, 1993). Extensins are the most extensively studied HRGPs of plants, making up 1-10% of the primary cell wall (Cassab and Varner, 1988).

Boron (B) is an essential micronutrient element for vascular plants and diatoms; however, its mechanism of action is not yet understood (Matoh 1997; Blevins and Lukaszewski, 1998). Many studies have implicated B in the biogenesis of plant membranes and cell walls (Goldbach et al., 1991; Bonilla et al., 1997). Deficiency symptoms first appear in actively growing tissues, within hours in root tips, and within minutes or seconds in pollen tube tips, and are characterized by cell wall abnormalities (Loomis and Durst, 1992; Blevins and Lukaszewski, 1998). However, it has been observed that in most plant species the B requirement for reproductive growth is much higher than for vegetative growth. The most dramatically rapid manifestation of B deficiency is seen in pollen tube growth. Without B, the pollen tubes of most species burst explosively, always at the outermost tip, ejecting large amounts of their contents. Growth of pollen tubes requires a continuing presence of B. Pre-germination treatment with B stimulates germination of pollen but does not maintain the integrity of the growing pollen tubes (Schmucker 1933, 1934). In general, Schmucker's results support a role of B as a cell wall cross-linker since B deficiency occurred specifically at the pollen tube tips, showing weakness of the newly formed wall. In fact, B is cross-linked with the rhamnoglacturonan (RG) II fraction of pectic polysaccharides in many plant species (Hu and Brown 1994; Kobayashi et al., 1996; Matoh et al., 1996; O'Neill et al., 1996). On the other hand, other candidates for borate crosslinking in primary cell walls are HRGPs and PRPs (Bonilla et al., 1997). However B seems to participate in membrane structure since it can form complexes with membrane constituents such as glycolipids and/or glycoproteins (Shkolnik, 1984; Cakmak et al., 1995). So far, the results of pollen growth studies are consistent with B-complexing cell wall polymers, while the lipid thermostability results show that B is important in membrane structure and function (Jackson, 1989). Whatever the mechanism, the role of B in reproductive growth is particularly striking.

Pollen grains of most species are naturally low in B, but in the styles, stigma, and ovaries, B concentration is usually high (Gauch and Dugger, 1954). However, there have been too few B measurements to substantiate this claim (Dell and Huang, 1997). The uniformly high B requirement for

reproductive growth across the plant kingdom is intriguing and indicates similarities between reproductive structures, so unlike other plant cell walls perhaps the composition of the pollen tube is similar across plant species (Blevins and Lukaszewski, 1998). Pex 1 is a pollen-specific extensin-like domain protein, involved in pollen tube growth that is expressed in starch-filled (mature) and in germinating pollen of maize (Rubinstein, et al., 1995b). Hence the pollen tube constitutes a good model to study processes related to cell wall protein assembly. In our study, we report that B affected the deposition of HRGPs into the pollen tube cell wall. This information may be important for understanding the mechanisms by which B controls reproductive growth in plants.

MATERIAL AND METHODS

Biological material and germination trials: Fresh pollen from maize (*Zea mays L.*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Impatiens sp.* and lily (*Lilium longiflorum.*) was immediately germinated after collection under two B conditions: B deficient medium (-B), (18% sucrose; 2mM CaCl₂; 0.5% agar) and B sufficient medium (+B) (18% sucrose; 2mM CaCl₂ and the following concentrations of boric acid: in *Impatiens sp.* 0.5 mM; in maize 1.0 mM; in tobacco 1.6 mM; pine 1.66 mM and in lily 0.162 mM. Pollen was considered to have germinated when the pollen tube was at least half as large as the grain length. Thirty trials were carried out on three different samples of each species; pollen observation was made with a stereoscopic microscope (Leika stereo zoom 6 Photo). The data on pollen germination and tube length were processed with the SAS software using the Tukey test for the comparison of means at $P \leq 0.05$.

Chemical analysis: All pollen samples were freeze-dried in a lyophilizer, when dry weights were determined. The quantity of hydroxyproline (Hyp_{tot}), hydroxyproline extractable in CaCl₂ (Hyp_{ext}), and non-soluble hydroxyproline (Hyp_{ins}) in pollen tubes and pollen grains was determined by a colorimetric method (Drozd et al. 1976), as follows: dry tissue was hydrolyzed in 6N HCl (3h at 120°C) and then the samples dried thoroughly under vacuum with a NaOH trap. The hydrolysates were resuspended in 100µl of H₂O and centrifuged in a microfuge to eliminate humus. To each sample and each HyPro standard (0.5µg and 0.05µg in 100 µl) 60 µl of the acetate-citrate buffer (0.1 g chloramine T; 1.0 ml H₂O; 2.0 ml acetate-citrate buffer) was added and 10

minutes later 120 µl of the second solution was added (1.0 ml of 72% perchloric acid; 5.0 ml PDMAB solution [6% w/v paradimethylaminobenzaldehyde (PDMAB) in isopropanol]. The tubes were then promptly placed in a hot water bath at 60°C for 20 minutes. This allows the colour to develop, and the absorbance was read in a spectrophotometer at 560 nm. The pollen Hyp_{Tot} level was obtained from grains hydrolyzed in 6N HCl (120°C, 3 h.).

Cell wall isolation. Pollen tubes were ground in a glass homogenizer and treated as described by Cassab et al. (1985).

Distribution of Hyp. The distribution of Hyp in pollen tubes was determined in germinated pollen from maize in the presence of 0.5 mM, 1.0 mM and 2.0 mM of boric acid for 2 h. First, pollen tubes were separated from pollen grains by briskly vortexing the solution, the pollen tubes were collected after filtering the solution through a 10 µm nylon mesh. To measure the quantity of Hyp_{Tot} the sample was hydrolyzed using 6N HCl (120°C, 3 h.), and evaluated by the colorimetric method (Drodz et al., 1976) described above. A fraction of the lyophilized sample was resuspended in 0.2 M CaCl₂ (Hyp_{Sol}) for 12 h. at 4°C, then the Hyp content was measured. The non-soluble material was lyophilized, weighed and hydrolyzed (HCl 6N, 120°C, 3h), and Hyp_{Ins} was also quantified. The data for total hydroxyproline (Hyp_{Tot}), hydroxyproline extractable in CaCl₂ (Hyp_{Ext}), and non-soluble hydroxyproline (Hyp_{Ins}) were processed with the SAS software using the Tukey test for the comparison of means at P ≤ 0.05.

Western blot and immunolocalization of HRGPs: Extractable proteins in 0.2 M CaCl₂ from pollen tubes grown on -B and +B were boiled in an equal volume of 2X SDS sample buffer (0.1M Tris, pH 6.8, 1.8% SDS, 18 [w/v] glycerol, 9% [w/v] 2-mercaptoethanol, 0.02% [v/v] bromophenol blue) and submitted to electrophoresis on SDS-PAGE gels (12%), using 4µg of protein for each sample. Protein content was determined by the Bradford method (1976) and silver nitrate was used as a stain. Proteins were electroblotted onto nitrocellulose paper (Hybond-C, Amersham) in a semi-dry medium (SemiPhor, Hoeffer) membrane, hydrated with a transfer buffer. The membrane was soaked with the primary HRGP antibody (Cassab and Varner, 1987) for 12 h (1:1300 dilution) dissolved in buffer (0.2% BSA, 0.1% Tween-20, 0.013 M Tris, pH 7.5, 0.15 M NaCl), washed three times in wash buffer (0.01% [v/v] tween-20, 0.013 M Tris pH 7.5,

0.15 M NaCl), and finally incubated for 1 hour with the secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase (anti-rabbit IgG, Zymed AP-Goat rabbit IgG). Colour reaction took place in the presence of alkaline phosphatase buffer.

For HRGPs immunolocalization, pollen tubes were fixed in FAA [10% (v/v) formaldehyde, 5% (v/v) acetic acid, and 50% ethanol] and mounted onto glass slides pre-treated with poly-lysine (Sigma). The primary antibody used was anti-HRGPs from soybean seed coats (Cassab and Varner, 1987) diluted 1:50, and the immunogold reagent 1:100 (ImmunoResearch), with which the sections were incubated 4 h, respectively, at room temperature. The secondary antibody was goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase diluted 1:100 with which sections were incubated for 4 h at room temperature, and the immunogold-silver staining performed as described by Springall et al. (1984). The negative control involved the substitution of the primary HRGP antibody with preimmune serum and anti-profilin antibody from bean, diluted 1:1000 and 1:50 respectively. Pollen tubes were visualized using a Zeiss Axioskop light microscope and photographed using ASA 100 Kodacolor film.

RESULTS

We studied the effect of B on *in vitro* pollen germination from different plants species. The results reported in table 1 showed that pollen germination of maize and tobacco pollen grains increased when B was present in growth medium, and henceforth these species were designated B dependent (Bd), whereas *Impatiens* sp., pine and lily pollen germination rates were less sensitive to B, and were designated B independent (Bi). However, the length of all pollen tubes analyzed was doubled in the presence of +B medium (table 2).

The content of Hyp_{Tot} differed in pollen grains from maize, tobacco, pine and *Impatiens* sp. (table 3). The content of Hyp_{Tot} in pollen from maize and tobacco (Bd) turned out to be 30% greater than that of pine, *Impatiens* sp., and lily (Bi). The value of Hyp_{Tot} for lily was similar to that of *Impatiens* sp. Therefore, there is not a strict correlation between high Hyp_{Tot} in pollen of Bd species as opposed to Bi species (table 3).

To evaluate the relationship between the B tube growth response and HRGP accumulation in the pollen tube wall, maize pollen was selected because of its: a) pollen tube size, b) high germination percentage and c) ease in separating the pollen tube from the pollen grain. We examined the distribution of Hyp in cell wall extracts, and isolated cell walls of maize pollen tubes (table 4).

Table 1. Pollen germination of different plant species in (+B) and (-B) *Impatiens sp.*, 0.5 mM; maize 1.0 mM, tobacco 1.66 mM pine, lily 0.162 mM of boric acid. The data are the means of six replicates.

Plant	Sufficient medium +B % Pollen germination	Deficient medium -B % Pollen germination
<i>Impatiens sp.</i>	14.7(±3.9) a	13.9 (±4.3) a
<i>Zea mays</i>	75.1(±5.6) a	5.3 (±2.3) b
<i>Pinus sp.</i>	74.6(±6.7) a	70.8 (±6.9) a
<i>Nicotiana tabacum</i>	67.3(±3.1) a	21.1(±4.5) b
<i>Lilium longiflorum</i>	17.6(±3.6) a	13.1(±3.9) a

Mean values in columns with the same letter are not significantly different, according to the Tukey test at $P < 0.05$.

Table 2. Pollen tube length (μm) of different species, for pollen grains germinated in boron deficient medium (-B) and boron sufficient medium (+B). Time (h) that pollen was incubated in the germination medium: ¹(8); ²(2); ³(24), ⁴(9), ⁵(6).

Plant	Sufficient medium +B Tube length (μm)	Deficient medium -B Tube length (μm)
<i>Impatiens sp.</i> ¹	260.5 (±53) a	128.7 (±61)b
<i>Zea mays</i> ²	457.3 (±64)a	130.2 (±28)b
<i>Pinus sp.</i> ³	122.4 (±20)a	61.5 (±15)b
<i>Nicotiana tabacum</i> ⁴	624.7 (±93)a	154.1 (±47)b
<i>Lilium longiflorum</i> ⁵	1235.6 (±234)a	704.1 (±124)b

Mean values in columns with the same letter are not significantly different, according to the Tukey test at $P < 0.05$.

Table 3. Total Hydroxyproline levels (Hyp_{Tot} , $\mu\text{g Hyp/mg}$ dry weight) in pollen from different plant species.

Pollen	+B
<i>Impatiens sp.</i>	0.87 (±0.03)c
<i>Zea mays</i>	1.01 (±0.06)b
<i>Nicotiana tabacum</i>	1.31(±0.07)a
<i>Pinus sp.</i>	0.68 (±0.03)d
<i>Lilium longiflorum</i>	0.89 (±0.06)c

Mean values in columns with the same letter are not significantly different, according to the Tukey test at $P < 0.05$.

Table 4. Distribution of Hydroxyproline (Hyp) in maize pollen tube cell walls.

(A)	Total hydroxyproline (Hyp_{Tot}) μg Hydroxyproline/mg pollen tube dry weight		
0.5 mM H_3BO_3	1.0 mM H_3BO_3	2.0 mM H_3BO_3	
0.53(±0.03)c ^z	0.63 (±0.03)a	0.63 (±0.03)a	
(B)	Extractable hydroxyproline in $\text{CaCl}_2(\text{Hyp}_{\text{Ext}})$ μg Hydroxyproline/ μg 0.2 M CaCl_2		
0.5 mM H_3BO_3	1.0 mM H_3BO_3	2.0 mM H_3BO_3	
0.13(±0.02)c	0.25 (±0.03)a	0.16 (±0.02)b	
(C)	Non-soluble hydroxyproline (Hyp_{Ins}) μg Hydroxyproline/ mg pollen tube dry weight		
0.5 mM H_3BO_3	1.0 mM H_3BO_3	2.0 mM H_3BO_3	
1.73(±0.02)c	4.15 (±0.03)a	2.69 (±0.03)b	

Mean values in columns with the same letter are not significantly different, according to the Tukey test at $P < 0.05$.

Since an optimum B concentration increased the levels of Hyp in both Hyp_{Ext} (48%) and $\text{Hyp}_{\text{Insol}}$ (16%) with respect to the control fractions, it was then of interest to determine whether B modifies the accumulation of HRGPs in pollen tubes. For this, a western blot analysis was performed on cell wall proteins of pollen tubes grown in the presence and absence of B, using a specific anti-HRGP antibody from soybean seed coats. This antibody is highly specific for HRGPs of both dicotyledonous and monocotyledonous plants, and does not cross react with arabino-galactan proteins, another class of HRGPs (Cassab and Varner, 1987). Cell wall fractions from pollen grains grown under -B conditions showed two high molecular weight bands. In contrast, the cell wall fraction from pollen grains grown on the +B medium did not contain polypeptides that were labeled by the HRGP antibodies (figure 1B).

To determine the localization of HRGPs in germinated maize pollen, we performed immunolocalization studies with anti-HRGP antibodies from soybean seed coats (figures 2A-D). In maize germinated pollen grains, HRGPs were primarily detected in the pollen tube wall which corresponds with the chemical analysis of Hyp in pollen tubes (table 4A). The detection of HRGPs in maize pollen tubes was very strong, although the antibody was not obtained from a monocotyledonous plant.

DISCUSSION

One of the major effects derived from the lack of B occurs during pollen germination and the formation of pollen tube (Loomis and Durst, 1992). Pollen grains of most species require a continuous supply of B (Steer and Steer, 1989; Taylor and Hepler, 1997). It has been reported that pollen from most plant species requires B to germinate (Bd); however pollen from some plant species germinates almost equally well in a B deficient environment (Bi) (table 1.) (Heslop-Harrison,

1971; Jackson, 1989). In addition, many physiological effects of B deficiency have been identified in the plant cell, such as impairments of sugar transport, membrane integrity, RNA metabolism, etc. (Heslop-Harrison, 1987; Cakmak and Römheld, 1997). The initial phase of germination includes processes that lead to the onset of pollen tube growth, when Bd species seem to be more sensitive to B deficiency, since their germination percentages diminished 13 times in maize and 3 times in *Nicotiana* (table 1).

On the other hand, pollen tube length from plant species utilized in these studies was increased after the addition of B (table 2). Previous studies have shown that the wall in the tip region of the pollen tube is mainly composed of pectins (Mascarenhas, 1993). The synthesis and modification of the pectic network is an active process directly associated with the complex boron-RGII-calcium (O'Neill et al., 1996). This suggests that the elongation and growth of the pollen tube is a consequence of this association (Kobayashi, et al., 1999).

Reports suggest that the B requirement of plants is determined by the RGII content of its cell wall. It has been shown that one gram of monocot cell wall contains 6%

of RGII and this could only covalently bind 8% μmol B considering dicot cell walls as 100% (O'Neill, 1996). Thus, the B pollen requirement could be determined by differences between pollen tube cell walls of Bi and Bd. In order to confirm this, we should evaluate a greater number of pollen plants species of the Bd and Bi types and measure the RGII fraction in both groups of plants.

Hydroxyproline was present in all pollen grain species tested, but the content of Hyp_{Tot} in pollen from maize and tobacco turned out to be 30% greater than pine, *Impatiens sp.*, and lily. However, further evaluation must be carried out to confirm this fact. Previous studies have suggested that HRGPs are abundant in sexual tissues since the presence of higher amounts of Hyp in the pollen and pollen tube has been reported. (Li et al., 1994; Rubinstein et al., 1995a; Jauh and Lord, 1996). In addition to their structural role, it has been suggested that pollen HRGPs could play roles in sexual recognition and signalling (Rubinstein, 1995b).

HRGPs are the most abundant structural proteins in maize sexual tissues and since (Hyp) is an amino acid resulting from post-translational modification that characterizes HRGPs, their protein level can be indirectly estimated when the Hyp concentration is quantified (Cassab and Varner, 1987; Kieliszewski and Lamport, 1994). Measurement of hydroxyproline levels have been utilized primarily in the study of cell walls since only trace amounts of hydroxyproline are found in the cytoplasmic fraction (Rubinstein et al., 1995a). The level of Hyp in the pollen tube wall of maize changed depending upon the B concentration in the growing medium (table 4A-C). The importance of HRGPs in cell walls of pollen tubes was evident, since 63% of Hyp_{Tot} from the maize pollen is located in the tube. This suggests that most of the Hyp in the grain was used for the construction of the cell wall during germination (table 4A). This value was high, considering that the pollen tube length in pollen germinated *in vitro* was up to 70% shorter than the length reached *in vivo* (Taylor and Hepler, 1997). At an optimal B concentration (1 mM), the level of total, extractable and insoluble Hyp was larger than at the other B concentrations tested (table 4). This suggests that an optimal concentration of B can facilitate the accumulation of HRGPs in the cell wall (Bonilla et al., 1997).

Previous studies have described the biochemical and physiological relationship between B and pectic substances, although little is known about the effect of B in plant cell wall assembly of HRGPs (Matoth et al., 1996; Matoth et al., 1997). Western blot analysis of cell wall proteins from

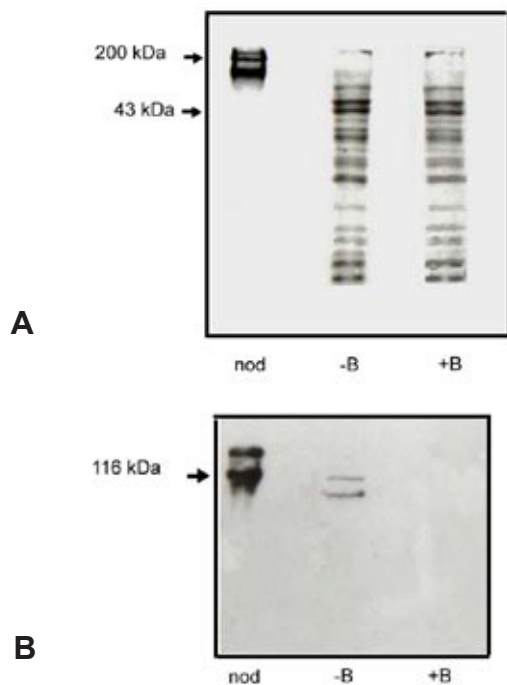


Figure 1. Characterization of extractable cell wall fractions from maize pollen tubes. (A) Cell wall salt-extractable proteins from maize pollen tubes grown in sufficient +B and deficient -B media. (B) Western blot analysis of maize pollen tubes. The blots were probed with anti-HRGP antibodies from soybean seed coat. Note that two HRGP glycoprotein bands for material grown in media -B were not observed in +B.

pollen tubes grown in the presence and absence of B (figure 1), suggested that in the presence of B, HRGPs might be modified and hence the specific HRGP antibodies did not recognize them. This alteration could be due to insolubility of HRGPs in the wall in the presence of B, or to the formation of a linkage between B and HRGPs, or both. It has been reported that HRGPs are slowly insolubilized into the cell wall by a covalent link (Qi et al., 1995). Furthermore, previous data showed that HRGPs are not covalently bound to the walls of B deficient nodules of soybean root, suggesting that B may have a role in the assembly of some wall protein components in nodules (Bonilla et al., 1997). Although there is an abundance of HRGP in the pollen tubes, only the maize pollen extensin-chimera PEX1 has been so far molecularly characterized. PEX1 seems to play a role in pollen tube growth during pollination (Rubinstein, et al., 1995b). Further investigations are essential to explain the assembly of the HRGPs in growing pollen tubes, and their relation with the B-RGII complex.

The accumulation of HRGPs in germinated pollen of maize grown in -B and +B was studied by immunocytochemical analysis (figure 2). HRGPs are deposited in the emerging pollen tube wall in enormous quantities, but there

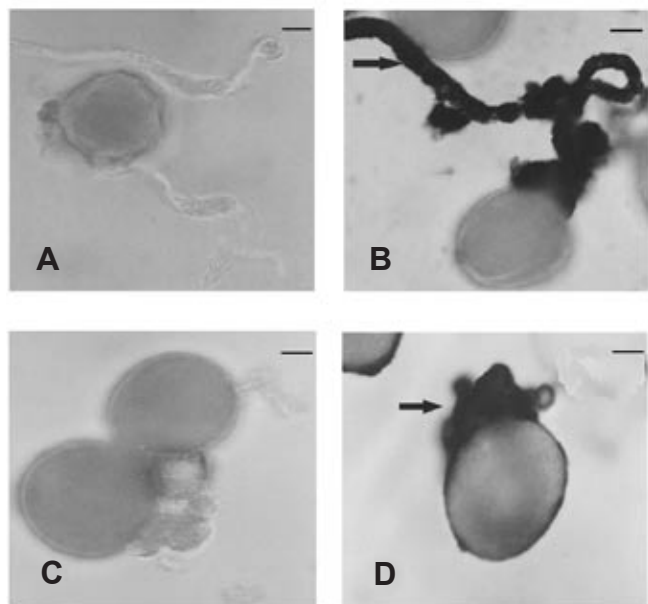


Figure 2. Immunolocalization of HRGPs in germinated pollen grains from maize. (A, C) germinated pollen grains incubated with preimmune serum. (B, D) germinated pollen grains incubated with anti-HRGPs antibodies from soybean seed coat. (A, B) pollen grains germinated in +B. Note that the labeling is associated with the cell wall (arrow) in (B) and the pollen tube burst without boron (D - arrow).

is no deposition of these glycoproteins in the pollen grain. It confirms that HRGPs are synthesized previous to germination and deposited in the cell wall of the growing pollen tube (Rubinstein et al., 1995a,c). It has been proposed that the HRGPs might provide structural support for the pollen tube necessary for its rapid growth, and have a role in sexual recognition and signalling during the fertilization (Rubinstein, et al., 1995b). Thus, the study of HRGPs of sexual tissues might help to elucidate the fertilization processes in plants.

As we demonstrated here, colorimetric evaluations of Hyp in maize pollen germinated in +B conditions indicated that during pollen tube growth there was an enormous amount of HRGPs that are secreted into the wall. In fact, approximately 63% of the Hyp_{Tot} was present in the pollen tube wall. Similar results were obtained with *Impatiens sp.* Hence, B deficiency probably impedes the assembly of HRGPs in the cell wall matrix.

Acknowledgments: We are grateful to Lorena López for her valuable help with the light microscopy analysis. E. G. was supported by fellowship No. 80369 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

REFERENCES

- Blevins DG, Lukaszewski KM (1998) Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:481-500.
- Bonilla I, Mergold-Villaseñor C, Campos ME, Sanchez N, Perez H, Lopez L, Castrejon L, Sanchez F, Cassab GI (1997) The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyproline-/proline-rich proteins. *Plant Physiol.* 115:1329-40.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cakmak I, Kurz H, Marschner H (1995) Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. *Physiol. Plant.* 95:11-18.
- Cakmak I, Römheld V. (1997) Boron deficiency induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil* 193:71-83.
- Cassab GI (1998) Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:281-309.
- Cassab GI, Nieto-Sotelo J, Cooper JB, Van Holst GJ, Varner JE (1985) A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. *Plant Physiol.* 77:532-535.
- Cassab GI, Varner JE (1987) Immunocytochemical localization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and tissue printing on nitrocellulose paper. *J. Cell Biol.* 105:2581-88.

- Cassab GI, Varner JE (1988) Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:321-53
- Dell B, Huang L (1997) Physiological response of plants to low boron. *Plant Soil* 193:103-120.
- Drozd M, Kucharaz E, Zyja J. (1976) A colorimetric micro-method for determination of hydroxyproline in blood serum. *Z. Med. Labortech.* 17:163-71.
- Gauch HG, Dugger WM Jr. 1954. The physiological action of boron in higher plants: a review and interpretation. College Park: Univ. Md., Agric. Exp. Stn.
- Goldbach HE, Blaser-Grill J, Lindemann N, Porzelt M, Hörmann C, Lupp B, Gessner B (1991) Influence of boron on net proton release and its relation to other metabolic processes. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 42:925-929.
- Heslop-Harrison J (1971) The pollen wall: structure and development. In: Heslop-Harrison J (ed), *Pollen: Development and physiology*, pp.75-98. Butterworth, London.
- Heslop-Harrison J (1987) Pollen germination and pollen-tube growth. *Int. Rev. Cytol.* 107:1-78.
- Hu H, Brown PH (1994) Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. *Plant Physiol.* 105:681-689.
- Jackson JF (1989) Borate control of protein secretion from *Petunia* pollen exhibits critical temperature discontinuities. *Sex. Plant Reprod.* 2:11-14.
- Jauh GY, Lord EM (1996) Localization of pectins and arabinogalactan proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* 199:251-261.
- Kieliszewski MJ, Lamport DTA (1994) Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant J.* 5:157-72.
- Kobayashi M, Matoh T, Azuma J (1996) Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* 110:1017-1020
- Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T, Matoh T (1999) Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca²⁺ retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiol.* 119:199-204.
- Li YQ, Chen F, Linskens HF, Cresti M (1994) Distribution of unesterified and esterified pectins in cell walls of pollen tubes of flowering plants. *Sex. Plant Reprod.* 7:145-152
- Loomis WD, Durst R W (1992) Chemistry and biology of boron. *Biofactors* 3: 229-239.
- Mascarenhas JP (1993) Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* 5:1303-1314.
- Matoh T, Kawaguchi S, Kobayashi M (1996) Ubiquity of a borate-rhamnogalacturonan II complex in the cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol.* 37:636-640.
- Matoh T. (1997) Boron in plant cell walls. *Plant Soil* 193: 59-70.
- O'Neill MA Warrenfeltz D, Kates K, Pellerin P, Doco T, Davill AG Albersheim P (1996) Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *In vitro* conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *J. Biol. Chem.* 271:22923-22930.
- Qi X, Behrens BX, West PR, Mort J (1995) Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures. (Evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin). *Plant Physiol.* 108:1691-701.
- Rubinstein AL, Prata RTN, Bedinger PA (1995a) Developmental accumulation of hydroxyproline and hydroxyproline-containing proteins in *Zea mays* pollen. *Sex. Plant Reprod.* 8:27-32.
- Rubinstein AL, Broadwater AH, Lowrey KB, Bedinger PA (1995b) Pex1, a pollen-specific gene with an extensin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3086-3090.
- Rubinstein AL, Márquez J, Suárez-Cervera M, Bedinger PA (1995c) Extensin-like glycoproteins in the maize pollen tube wall. *Plant Cell* 7:2211-2225.
- Schmucker T (1933) Zur Blütenbiologie tropischer Nymphaeaarten. II (Bor als entscheidender faktor). *Planta* 18:641-650.
- Schmucker T (1934) Über den Einfluss von borsäure auf pflanzen insbesondere keimende pollenkorner. *Planta* 23: 264-283.
- Shkolnik MY (1984) Trace elements in Plants. Elsevier, New York.
- Showalter AM (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5:9-23.
- Sommer-Knudsen J, Bacic A, Clarke AE (1997). Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry* 47: 483-497.
- Springall, D R, Hacker G H, Grimelius L, Polak J M (1984). The potential of the immunogold-silver staining method for paraffin sections. *Histochemistry* 81: 603-608.
- Steer MW, Steer JM (1989) Pollen tube tip growth. *New Phytol.* 111:323-358.
- Taylor LP, Hepler PK (1997) Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 48: 461-91.